

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

**Efeito do canabidiol sobre a reconsolidação da memória de medo ao
contexto: envolvimento dos receptores CB1 do córtex pré-límbico**

CRISTINA APARECIDA JARK STERN

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial à obtenção do título de doutor em Farmacologia.

Orientador: Dr. Leandro José Bertoglio

Florianópolis, 13 de fevereiro de 2014

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Stern, Cristina Aparecida Jark

Efeito do canabidiol sobre a reconsolidação da memória de medo ao contexto: envolvimento dos receptores CB1 do córtex pré-límbico / Cristina Aparecida Jark Stern ; orientador, Leandro José Bertoglio - Florianópolis, SC, 2014.

136 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

Inclui referências

1. Farmacologia. 2. Canabidiol. 3. Córtex pré-límbico. 4. Reconsolidação. 5. Condicionamento de medo. I. Bertoglio, Leandro José. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. III. Título.

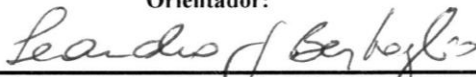
“Efeito do canabidiol sobre a reconsolidação da memória de medo ao contexto: envolvimento dos receptores CB1 do córtex pré-límbico”

por

Cristina Aparecida Jark Stern

Tese julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (Port. 06/PPGFMC/2014) do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia - UFSC, composta pelos Doutores:

Orientador:



Dr(a). Leandro José Bertoglio (FMC/CCB/UFSC)


Banca Examinadora:



Dr(a). Roberto Andreatini (Farmacologia/UFPR)



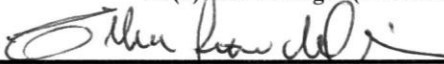
Dr(a). Jorge Alberto Quillfeldt (Biofísica/UFRGS)



Dr(a). Marcelo Giachero (PPGFMC/CCB/UFSC)

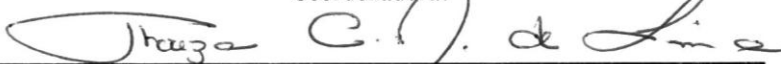


Dr(a). Rui Prediger (FMC/CCB/UFSC)



Dr(a). Cilene Lino de Oliveira (CFS/CCB/UFSC)

Coordenadora:



Dr(a). Thereza Christina Monteiro De Lima
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia

Florianópolis, 13 de fevereiro de 2014.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Leandro José Bertoglio, pela oportunidade e pela confiança depositada na realização desse trabalho. Agradeço também pela orientação e pela amizade durante esse tempo de convivência em seu laboratório.

Ao professor Dr. Reinaldo Takahashi, que abriu as portas de seu laboratório e auxiliou muito para a execução desse trabalho, além de contribuir com seus ensinamentos para a minha formação científica.

Ao professor Dr. Antônio de Pádua Carobrez, pela colaboração e amizade durante o tempo que trabalhamos junto e pelas valiosas sugestões para esse trabalho.

Aos professores do programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Dr. Giles A. Rae, Dra. Thereza Cristina Monteiro de Lima, Dr. Rui Prediger e Dr. Geison Izidio, que avaliaram o meu exame de qualificação de doutorado e contribuíram com suas valiosas sugestões para o término desse trabalho.

Aos demais professores do programa de Pós-Graduação em Farmacologia, que contribuíram para a minha formação científica.

Ao professor Dr. Francisco Guimarães, pela colaboração e apoio para a realização desse trabalho e por abrir o seu laboratório para a realização de alguns experimentos.

Ao professor Dr. Antônio Zuardi, pela confiança e apoio dado para a realização desse trabalho.

Às professoras, Dra. Maria Claudia dos Santos Silva e Msc. Nicéia Souza, que me iniciaram na vida científica.

Aos professores, Dr. Jorge Quillfeldt, Dr. Roberto Andreatini, Dra. Cilene Lino de Oliveira, Dr. Rui Prediger, Dr. Geison Izídio e Dr. Marcelo Giachero, por aceitarem avaliar e colaborar no aprimoramento desse trabalho.

Aos meus colegas do laboratório de Neuropsicofarmacologia, Lucas, Ana, Rafael, Maria Alice e Heloísa, por toda amizade, colaboração e pelos muitos dias de trabalho que passamos juntos.

Aos colegas de departamento, Ju Kroon, Cris Mochny, Karla Guarido, Alessandra Martini, Stefania Forner, Ana Paula Ramos, pela amizade e pela colaboração todos esses anos.

Ao Claudinho, pelo apoio, pelo companheirismo e principalmente pelo amor e dedicação que temos um com o outro.

Às minhas amigas, Thaís, Ivana, Jana, Vânia, Regina, Pryscila, Flávia e Rejane, pela nossa amizade que vale ouro. Vocês serão sempre levadas em meu coração.

Aos meus pais, Carin e Bubi, e aos meus irmãos Ina, Carina e Carlos, pelo carinho dedicado em todos os momentos.

Aos meus sobrinhos, Gabriel e Murilo, que sempre trazem alegria para a minha vida.

À Bia, que mesmo longe está sempre ao meu lado.

Ao Sr. Milton dos Santos e à dna. Marina, por abrirem as portas de sua casa todos os dias e me receberem com tanto carinho e amor.

À Sininho, Maya e Pandora e a todos os westies da minha vida, vocês me ajudaram a manter a forma durante essa fase de estudos.

Aos funcionários do departamento de farmacologia, pela dedicação.

Aos funcionários do Lameb, Chirle, Demétrio e Emily, por toda ajuda fornecida para a utilização do microscópio e realização das fotos para quantificação do Zlf268.

Ao CNPq, pelo suporte financeiro.

A todas as pessoas que de alguma maneira colaboraram na execução desse trabalho.

“Seja você mesmo e o mundo tornar-se-á mais belo e mais rico”.

(Hermann Hesse)

RESUMO

A busca por drogas que prejudicam a reconsolidação de memórias traumáticas pode ter um impacto clínico bastante importante. O canabidiol (CBD) é o principal componente da *Cannabis sativa* desprovido de efeitos psicotomiméticos e seguro para o uso em animais de laboratório e em humanos. Considerando que o CBD atenua a expressão da ansiedade e facilita o processo de extinção de memórias aversivas, o objetivo do presente trabalho foi investigar em ratos se ele também interfere com a reconsolidação de uma memória de medo condicionada ao contexto, bem como avaliar a participação do córtex pré-frontal medial (CPFm) no processo de reconsolidação e nos efeitos sistêmicos do CBD. Para tanto, imediatamente após a evocação da memória de ratos previamente condicionados, o CBD foi administrado (3 – 30 mg/kg). Foi observado, uma redução na porcentagem de congelamento até 22 dias após o tratamento com a dose de 10 mg/kg. Não ocorreu reinstalação da memória, e o mesmo efeito foi observado quando testado em uma memória mais velha (7 dias), foi bloqueado pelo antagonista dos receptores canabinoides do tipo 1 (AM251 1 mg/kg; CB1), mas não pelo antagonista dos receptores de serotonina do tipo 5-HT_{1A} (WAY 0,1 mg/kg), e não foi evidente quando a evocação da memória foi omitida. Tais resultados indicam que o CBD prejudica a reconsolidação de uma memória aversiva, um efeito dependente da ativação indireta do sistema endocanabinoide. Uma hora após a evocação da memória, foi observado um aumento na expressão da proteína Zif268 no CPFm, principalmente nas subdivisões do córtex cingulado (CC) e pré-límbico (PL), mas não no infralímbico (IL). Esse aumento não foi observado quando a memória não foi evocada e foi atenuado com a administração de CBD. Esse conjunto de resultados sugere que o CC participa da reconsolidação, indicando também um papel para o PL nesse fenômeno. Para confirmar o papel do córtex PL na reconsolidação, essa estrutura foi inativada imediatamente após a evocação da memória de 1, 7 e 21 dias. Em todos os casos, foi observada, uma redução na porcentagem de congelamento quando os animais foram retestados no dia seguinte. Novamente, esse efeito foi duradouro e não sofreu reinstalação, confirmando que a atividade do córtex PL é importante para essa etapa de re-estabilização da memória. Quando o CBD foi administrado sistemicamente, o bloqueio dos receptores CB1 com AM251 (50 pmol/0.2 µL) no córtex PL preveniu o efeito amnésico. A inibição da FAAH pelo URB597 (200 pmol/0,2 µL)

administrado diretamente no córtex PL imediatamente após a evocação da memória, também prejudica a reconsolidação. Em conjunto, esses resultados confirmam a participação do córtex PL na reconsolidação de uma memória de medo e demonstram que os receptores CB1 dessa área são recrutados pelo CBD quando ele prejudica a reconsolidação.

Palavras-chave: córtex pré-límbico, canabidiol, reconsolidação, condicionamento de medo.

ABSTRACT

The search for reconsolidation blockers may uncover clinically relevant drugs to disrupt memories of significant stressful life experiences. In this sense, cannabidiol (CBD), the major non-psychotomimetic component of *Cannabis* and a compound safe to be used in rodents and in humans, might be relevant. Based on the fact that CBD facilitates fear extinction and is anxiolytic, and on the evidence that many CBD effects are mediated by the medial prefrontal cortex activity (mPFC), the aim of the present study was to evaluate whether the systemic injection of CBD in rats, could mitigate an established contextual fear memory, by blocking its reconsolidation, evaluating the role of mPFC in this step of memory processing and in the CBD effects. CBD (3 – 30 mg/kg) was administered immediately after fear memory retrieval in rats previously conditioned. It was observed a reduction in the percentage of freezing time until 22 days after the treatment, with the most effective dose (10 mg/kg). This effect was not accompanied by fear memory reinstatement, it was seen when tested in an older memory (7 days old), it could be blocked by the cannabinoid receptor CB1 antagonist AM251 (1 mg/kg), but not by the serotonin receptor 5-HT_{1A} antagonist WAY100635 (0.1 mg/kg), suggesting that CBD disrupts fear memory reconsolidation by the endocannabinoid system. One hour after retrieval, it was observed an increase in Zif268 expression in the mPFC, mainly in its cingulate (CC) and prelimbic (PL) parts, but not in infralimbic (IL). When memory retrieval was omitted, the Zif268 expression was not seen and the CBD systemic administration prevented the expression in CC and PL. These results confirm the CC role in reconsolidation and suggest a role for PL cortex. To confirm the role of PL cortex in fear memory reconsolidation, this structure was temporarily inactivated with muscimol (4.0 nmol/0.2 µL) immediately after retrieval of different memory ages (1, 7 and 21 days old). In all cases, a reduction in the percentage of freezing time was observed one day later. This effect was long lasting and did not present reinstatement, confirming that PL cortex activity subserves fear memory reconsolidation. When the CBD was administered systemically, the blockade of CB1 receptors with AM251 (50 pmol/0.2 µL) in PL cortex prevented the CBD effect in fear memory reconsolidation. The inhibition of FAAH by URB597 injected bilaterally into the PL cortex (200 pmol/0.2 µL) immediately after fear memory retrieval also impaired its reconsolidation. Altogether, the results confirm that the

activity of PL cortex subserves fear memory reconsolidation, acting as a neural substrate to the CBD effects.

Key words: prelimbic cortex, cannabidiol, reconsolidation, fear conditioning.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. As duas visões da memória.....	26
Figura 2. Estrutura química do canabidiol.....	31
Figura 3. Estrutura citoarquitetônica do córtex.....	34
Figura 4. Representação esquemática das porções do córtex pré-frontal medial de ratos.....	35
Figura 5. Conexões entre o córtex pré-frontal medial, a amígdala e o hipocampo.....	36
Figura 6. Desenho esquemático do córtex pré-frontal medial de ratos.....	43
Figura 7. Desenho esquemático da etapa de familiarização.....	48
Figura 8. Desenho esquemático da sessão de treino.....	48
Figura 9. A: Desenho esquemático da etapa de evocação da memória. B: Desenho esquemático da etapa sem a evocação da memória.....	49
Figura 10. Desenho esquemático do Teste A.....	50
Figura 11. Desenho esquemático da sessão de extinção da memória.....	50
Figura 12. Desenho esquemático da sessão de reinstalação da memória.....	51
Figura 13. Desenho esquemático do Teste B.....	51
Figura 14. Evidência do efeito amnésico do CBD e do MDA sobre a reconsolidação da memória de medo ao contexto.....	54
Figura 15. O efeito do CBD e do MDZ sobre a reconsolidação da memória é restrito à janela temporal da reconsolidação.....	57
Figura 16. Ausência de recuperação espontânea até 22 dias após o tratamento com CBD.....	58
Figura 17. A memória cuja reconsolidação foi prejudicada pela administração de CBD não apresenta reinstalação.....	60
Figura 18. O CBD bloqueia a reconsolidação de uma memória de 7 dias.....	62
Figura 19. O prejuízo da memória causado pelo CBD é mediado pelos receptores canabinoides do tipo 1 (CB1) e não pelos receptores de serotonina do tipo 5-HT _{1A}	64
Figura 20. O CBD reduz a expressão de Zif268 induzida pela evocação da memória no córtex pré-límbico e cingulado.....	66
Figura 21. A inativação do córtex PL prejudica a reconsolidação da memória de medo.....	69
Figura 22. A memória cuja reconsolidação foi prejudicada pela inativação do PL é duradoura e não apresenta reinstalação.....	72

Figura 23. A atividade do córtex PL é importante para a reconsolidação de memórias recentes e remotas.....	74
Figura 24. O prejuízo da memória causado pelo CBD é mediado pelos receptores canabinoides do tipo 1 (CB1) presentes no córtex PL.....	76
Figura 25. A inibição da degradação da anandamida no córtex PL prejudica a reconsolidação da memória de medo ao contexto.....	77
Figura 26. O desbalanço endocanabinoide no TEPT e o tratamento com CBD.....	99

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: A inativação temporária do córtex PL não modifica a porcentagem de tempo de congelamento quando a evocação da memória é omitida.....	71
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABL: amígdala basolateral

Arc: do inglês “*activity-regulated cytoskeletal protein*”.

AEA: anandamida

AL: amígdala lateral

AM: amígdala medial

AM251: *N*-(Piperidina-1-il)-5-(4-iodofenila)-1-(2,4-diclorofenila)-4-metil-1*H*-pirazol-3-carboxamida

CB1: receptor canabinoide do tipo 1

CBD: canabidiol

CC: córtex cingulado

CeL: amígdala centro lateral

CeM: amígdala centro medial

CPF: córtex pré-frontal

CPFm: córtex pré-frontal medial

CREB: do inglês “*cAMP-responsive element binding protein*”.

DMSO: dimetil sulfóxido

DPX: *D.P.X. mountant for histology*

EC: estímulo condicionado

EI: estímulo incondicionado

E.P.M.: erro padrão da média

FAAH: do inglês *fatty acid amide hydrolase*

GABA: ácido gama-aminobutírico

HD: hipocampo dorsal

IL: infralímbico

I.P.: intraperitoneal

ITC: células intercaladas

Kg: quilograma

LTP: do inglês *long term potentiation*

MDZ: midazolam

mg: miligrama

ml: mililitro

MUS: muscimol

NaCl: cloreto de sódio

NfκB: do inglês “*nuclear factor-kappa B*”.

nmol: nanomol

pmol: picomol

PBS: tampão fosfato salina

PL: pré-límbico

TEPT: transtorno de estresse pós-traumático

THC: delta-9 tetrahydrocannabinol

μL: microlitro

URB597: Ácido Ciclohexilcarbâmico 3'-(Aminocarbonila)-[1,1'-bifenila]-3-il éster

WAY100635: maleato de N-[2-[4-(2-Metoxifenila)-1-piperazinil]etil]-N-2-piridinil ciclohexano carboxamida

Zif268: do inglês “*zinc finger transcription factor*”

5-HT: serotonina

SUMÁRIO

1. Introdução.....	21
1.1 A formação das memórias.....	21
1.2 Condicionamento de medo ao contexto.....	24
1.3 A teoria da reconsolidação – a visão clássica e a mudança.....	25
1.4 Reconsolidação – quando, como e onde?.....	27
1.5 O sistema endocanabinoide.....	29
1.6 O canabidiol.....	30
1.7 Córtex pré-frontal medial.....	32
1.8 O transtorno do estresse pós-traumático.....	37
2. Hipótese.....	39
3. Objetivo geral.....	39
3.1 Objetivos específicos.....	39
4. Material e Métodos.....	41
4.1 Animais.....	41
4.2 Drogas.....	41
4.3 Cirurgia estereotáxica.....	42
4.4 Microinjeção central.....	43
4.5 Condicionamento de medo ao contexto e reconsolidação.....	44
4.6 Extinção da memória de medo ao contexto.....	45
4.7 Reinstalação da memória de medo ao contexto.....	45
4.8 Preparo das amostras para imunohistoquímica.....	45
4.9 Imunohistoquímica para Zif268.....	46
4.9.1 Regiões de interesse e quantificação do Zif268.....	46
4.9.2 Análise estatística.....	47
4.9.3 Protocolo experimental.....	47
5. Resultados.....	53
5.1 Experimento 1: O canabidiol bloqueia a reconsolidação da memória de medo ao contexto.....	53
5.2 Experimento 2: O tratamento com CBD seis horas após a evocação não prejudica a reconsolidação.....	55
5.3 Experimento 3: O efeito amnésico do CBD persiste ao longo do tempo.....	56

5.4	Experimento 4: A memória prejudicada pelo CBD não sofre reinstalação.....	59
5.5	Experimento 5: O CBD prejudica a reconsolidação de uma memória de 7 dias.....	61
5.6	Experimento 6: O efeito do amnésico do CBD depende da ativação dos receptores CB1.....	61
5.7	Experimento 7: A administração sistêmica de CBD reduz a expressão de Zif268 no córtex pré-frontal medial.....	63
5.8	Experimento 8: A inativação temporária do córtex PL prejudica a reconsolidação da memória de medo ao contexto.....	65
5.9	Experimento 9: O resultado da inativação do PL é duradouro e não está sujeito a reinstalação da memória.....	68
5.10	Experimento 10: A atividade do PL é importante para a reconsolidação de memórias recentes e remotas.....	70
5.11	Experimento 11: O bloqueio dos receptores CB1 no córtex PL impede o efeito da administração sistêmica de CBD sobre a reconsolidação.....	75
5.12	Experimento 12: O bloqueio da enzima de degradação de anandamida no córtex PL bloqueia a reconsolidação da memória de medo ao contexto.....	76
6.	Discussão.....	79
6.1	Padronização do protocolo de condicionamento e de reconsolidação.....	79
6.2	Sobre o efeito do canabidiol na reconsolidação.....	80
6.3	O mecanismo de ação do canabidiol na reconsolidação.....	83
6.4	A evocação da memória aumenta a expressão de Zif268 no córtex pré-límbico e córtex cingulado.....	85
6.5	A administração de CBD imediatamente após a evocação da memória reduz a expressão de Zif268 no córtex pré-límbico e córtex cingulado.....	87
6.6	A inativação do córtex pré-límbico prejudica a reconsolidação da memória de medo ao contexto.....	91
6.7	A atividade do córtex PL modula a reconsolidação de memórias remotas.....	94
6.8	O bloqueio dos receptores CB1 no córtex PL previne o efeito do canabidiol sobre a reconsolidação da memória.....	94

6.9 A inibição da degradação de anandamida no córtex pré-límbico
prejudica a reconsolidação da memória de medo ao
contexto.....97

7. Considerações finais.....101

8. Conclusões.....105

9. Referências.....107

10. Anexo: Artigos publicados.....133

1. Introdução

A formação e o uso das memórias é um evento crítico para o funcionamento normal dos indivíduos, incluindo a execução de comportamentos direcionados a um objetivo, a resolução de problemas e a tomada de decisão. O termo memória significa as mudanças no comportamento dos indivíduos como consequência de suas experiências prévias, assim, a memória também contribui para modelar a personalidade humana e as interações sociais dos indivíduos, além de estar no centro de uma diversidade de transtornos cognitivos e emocionais. Dessa maneira, a formação, evocação, atualização e uso das memórias produz um impacto muito importante em diversas áreas da vida humana, entre elas, a saúde mental (ALBERINI & LEDOUX, 2013), o que justifica a busca pelo entendimento de seu processamento dinâmico. Assim, a compreensão da formação de uma memória, esteja ela dentro de faixas adaptativas ou patológicas, fornece uma oportunidade para que suas etapas de formação e/ou manutenção, sejam utilizadas como alvos terapêuticos.

1.1 A formação das memórias

Para que uma memória seja acessada e evocada é necessário que ela passe pelas etapas de aquisição e estabilização (DUDAI, 2004). Dessa maneira, a aquisição de uma memória ocorre quando um indivíduo depara-se pela primeira vez com a experiência que gera o aprendizado. Nesse momento, as informações chegam ao cérebro através dos órgãos sensoriais e do córtex sensorial primário. Os circuitos específicos de neurônios ativados durante a formação da memória sofrem modificações e alterações plásticas que sustentam, a longo prazo, o armazenamento de informações relacionadas ao evento original. Essas modificações requerem o envolvimento complexo e temporalmente orquestrado de estruturas cerebrais, sistemas transmissores e cascatas celulares específicas (MCAUGH, 2000). Saiba-se que as memórias não são codificadas instantaneamente, mas estabilizadas gradualmente ao longo do tempo, durante a etapa de consolidação (MÜLLER & PILZECKER, 1900; DUDAI, 2004).

Reforçando os estudos iniciais de HEBB (1949), a potencialização de longa duração (LTP, do termo em inglês: *long term potentiation*), um dos mecanismos celulares e moleculares da consolidação e que requer a modificação sináptica persistente,

induzida principalmente pela ativação dos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA foi proposta posteriormente (BLISS & COLLINGRIDGE, 1993).

A formação de uma memória requer a ação de um estímulo relevante, com consequente ativação dos receptores NMDA causando um aumento do influxo de cálcio (BLISS & COLLINGRIDGE, 1993), o recrutamento de cascatas intracelulares, como o das proteínas kinases A e C (COLLEY, SHEU & ROUTTENBERG, 1990) e a indução da síntese de algumas proteínas, como o BDNF e Arc, que em conjunto irão gerar um remodelamento sináptico (MCGAUGH, 2000). Consequentemente, ocorre um aumento da superfície sináptica e da densidade de receptores na membrana. Em conjunto, essas mudanças geram uma alteração sustentada das sinapses, caracterizando a LTP (DUDAI, 2004).

A LTP é um mecanismo de plasticidade que ocorre em diversas regiões do encéfalo, e que na formação de memórias aversivas recruta regiões como hipocampo, amígdala e córtex pré-frontal medial (CPFm; MCGAUGH, 2000; TAN *et al.*, 2010) bem como requer a ativação dos receptores glutamatérgicos, colinérgicos, noradrenérgicos, dopaminérgico e canabinoides, entre outros (KATZ & HALSTEAD, 1950; AGRANOFF & DAVIS, 1965; LIN *ET AL.*, 2011; JACOB *ET AL.*, 2012). Inibidores de síntese proteica e de diversos sistemas de neurotransmissão são capazes de bloquear a consolidação de uma memória, a qual acontece dentro de um período de tempo de 6 h (FLEXNER *ET AL.*, 1967; IZQUIERDO *ET AL.*, 1999; MCGAUGH, 2000).

A relação entre a função do hipocampo e a consolidação começou a ser feita com as observações de Scoville & Milner (1957) sobre o paciente H.M., que teve o lobo temporal medial, incluindo partes do hipocampo e da região parahipocampal, lesionadas aos 27 anos. Após esse fato, H.M. apresentou uma amnésia severa e um prejuízo seletivo da memória recente, mas não de eventos mais remotos. A grande capacidade do hipocampo de codificar os processos mnemônicos pode ser atribuída, em parte, pela sua organização funcional em um circuito trissináptico que permite alta eficiência na recepção e gerenciamento de informações (NEVES, COOKE & BLISS, 2008). Através desse circuito relativamente simples, as vias hipocampais constituem um dos melhores sistemas experimentais para o estudo dos mecanismos de plasticidade sináptica relacionados ao armazenamento de memórias, o que justifica o fato da LTP ter sido

inicialmente demonstrada em fatias de hipocampo (NEVES, COOKE & BLISS, 2008).

Mais recentemente, a consolidação das memórias aversivas tem sido associada não apenas ao funcionamento do hipocampo dorsal de roedores. Por suas conexões com o CPFm e com os núcleos da amígdala, tem-se mostrado a importância dessas outras regiões na consolidação (TAN *et al.*, 2011; CHOI, GOURLEY & RESSLER, 2012; EINARSSON & NADER, 2012). O papel do CPFm em relação ao armazenamento das memórias era mais restrito às memórias remotas, e consequentemente à consolidação sistêmica (FRANKLAND *et al.*, 2004), um processo pelo qual as memórias são realocadas no cérebro ao longo do tempo. Através desse mecanismo, as memórias se tornariam menos hipocampo-dependentes e mais dependentes do córtex (QUINN *et al.*, 2008). Hoje, sabe-se que a consolidação de memórias aversivas também depende da atividade de duas principais regiões do CPFm, o córtex cingulado (CC) e o pré-límbico (PL; CHOI *et al.*, 2010; ZHANG, FUKUSHIMA & KIDA, 2011; EINARSSON & NADER, 2012), que em concerto com a região CA1 do hipocampo auxiliam na representação global de um contexto (HYMAN *et al.*, 2012) e nos mecanismos de LTP (LIM *et al.*, 2010; SAKATA *et al.*, 2013).

Outra região crítica para a formação de memórias aversivas associativas, a amígdala basolateral (ABL) também depende de conexões com o CPFm para exercer essa função (TAN *et al.*, 2011). Especificamente, a conectividade funcional entre a ABL e o córtex PL é fortemente modulada pelo sistema endocanabinoide: antagonistas dos receptores CB1 que bloqueiam a LTP entre o circuito PL – ABL também bloqueiam a formação da memória de medo, demonstrando a importância da integridade desse sistema para a formação de uma memória aversiva (TAN *et al.*, 2010; 2011).

Uma vez consolidada, a memória pode ser evocada. A evocação é um processo complexo que permite que a informação previamente adquirida possa ser utilizada (GIACHERO, 2013). A etapa de evocação subdivide – se em outras duas: a reativação dos circuitos sinápticos formados na consolidação e a expressão, que em roedores ocorre através de comportamentos (TULVING, 1983).

A evocação da memória pode ter duas consequências, a primeira seria induzir um novo processo de labilidade da memória, e a segunda seria fornecer uma oportunidade de atualizar essa memória. Esses dois fenômenos são abordados nos estudos de reconsolidação (ALBERINI, 2011) que utilizam como principal ferramenta de estudo, os modelos de condicionamento de medo.

1.2 Condicionamento de medo ao contexto

O medo e a ansiedade são respostas adaptativas geradas pela antecipação ou pela presença de uma ameaça à homeostasia do organismo (PAPE & PARE, 2010) e enquanto o primeiro é gerado por pistas ou contextos, o segundo não necessita da presença de uma ameaça iminente/específica (DAVIS, 2000). Essas emoções são controladas hierarquicamente por diversos sistemas neurais que controlam a eficácia da resposta e permitem que o organismo se adapte à nova situação, assegurando uma resposta emocional adequada que retorna ao nível basal na ausência da situação ameaçadora (PAPE & PARE, 2010). Quando o indivíduo não consegue se adaptar a essas ameaças, doenças como os transtornos de ansiedade generalizada, pânico e estresse pós-traumático podem ser consequências (WEISBERG, 2009).

Dentre os diversos paradigmas experimentais utilizados para estudar memórias aversivas, o condicionamento Pavloviano (PAVLOV, 1927) encontra-se em destaque devido a sua grande utilidade e consequente sucesso, uma vez que também pode ser utilizado em seres humanos (PHELPS & LEDOUX, 2005). Nesse paradigma, os indivíduos associam um estímulo sensorial prévio (estímulo condicionado: EC; luz, som, odor ou contexto) com um estímulo aversivo coincidente, usualmente um choque (estímulo incondicionado: EI). A partir de então, uma memória associativa é formada e a re-exposição subsequente ao EC gera no animal a expressão de comportamentos de defesa (fuga, congelamento, esquiva), reações autonômicas (hipertensão e taquicardia) e endócrinas (elevação dos níveis de corticosterona e recrutamento de outros sistemas neuro-hormonais; LEDOUX, 2000).

Diversas são as vantagens de se usar o condicionamento como modelo experimental. Entre elas, destaca-se a possibilidade de identificar fatores genéticos e sistemas neurais que guiam um comportamento de defesa e como os mesmos são influenciados pelo ambiente; e a possibilidade de estudar os mecanismos de aprendizado e memória que participam da etiologia dos transtornos de ansiedade e de estresse, uma vez que, enquanto ainda contraditório se esses transtornos são de fato manifestações patológicas dos mecanismos de aprendizado aversivo normais, é consenso que as estruturas encefálicas envolvidas nesse aprendizado apresentam um funcionamento anormal em indivíduos doentes (SHIN, RAUCH & PITMAN, 2006).

Nos últimos anos foram feitos diversos avanços no entendimento de como modificações sinápticas induzidas pelo condicionamento tornam-se estabilizadas durante a consolidação da memória (MCGAUGH, 2000) e como as mesmas podem ser modificadas ou mantidas durante a reconsolidação (PRZYBYSLAWSKI E SARA, 1997; NADER, SCHAFE & LEDOUX, 2000; DUVARCI, NADER & LEDOUX, 2005; BUSTOS *et al.*, 2010; CASSINI *et al.*, 2013; DE OLIVEIRA ALVARES *et al.*, 2013).

1.3 A teoria da reconsolidação – a visão clássica e a mudança

Pelo menos por um século, se acreditava que o processo pelo qual uma memória de longa duração é formada, consolidada e evocada era um processo singular e linear. A teoria clássica da consolidação afirmava que uma memória, após ser armazenada, se tornava fixa ao longo do tempo, sofrendo uma única etapa de estabilização e que após essa fase, não seria mais passível de sofrer modificações. No entanto, nos anos 60 e 70, alguns trabalhos mostraram que agentes amnésicos eram capazes de provocar seus efeitos não apenas em novas memórias, mas também naquelas já consolidadas, quando o tratamento era feito após a sua evocação (MISANIN, MILLER & LEWIS, 1968; MACTUTUS, RICCIO & FERREK, 1979). Por exemplo, foi demonstrado que um choque eletroconvulsivo em ratos, 24 horas após a consolidação da memória precedida da apresentação do estímulo condicionado (EC) causou uma amnésia retrógrada (perda da memória previamente adquirida) nesses animais (MISANIN, MILLER & LEWIS, 1968). Dessa maneira, os autores sugeriram que o eletrochoque interferiu com o traço de memória que estava em trânsito para um estado ativo.

O trabalho de Mactutus *et al.* (1979) baseou-se na premissa de que memórias mais velhas são menos susceptíveis de sofrerem interferências e em trabalhos que sugeriam que a intensidade da evocação da memória era o que determinava a sua vulnerabilidade, mais do que a idade. Assim, foi mostrado novamente em ratos, que uma manipulação mais severa (nesse caso a indução de hipotermia) era capaz de causar uma amnésia retrógrada mesmo em uma memória mais velha, o que não ocorreu quando foi feita uma hipotermia leve. Dessa maneira, esse trabalho contribui com a ideia de que memórias de diferentes idades compartilham algumas características (MACTUTUS *et al.*, 1979).

No entanto, esse tema, que para a época era uma quebra de paradigma, ficou “esquecido” por quase quarenta anos, quando em 1997, Przybylski e Sara mostraram que uma memória espacial de ratos poderia ser prejudicada pela administração de um antagonista dos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA após a sua evocação, sugerindo mais uma vez que após a evocação a memória entraria em novo período de labilidade podendo se reorganizar ao longo do tempo. Assim, ao contrário do que se acreditava, a cada evocação, nos lembrariamos da memória resultante da última evocação e reconsolidação, e não a memória original (Fig. 1).

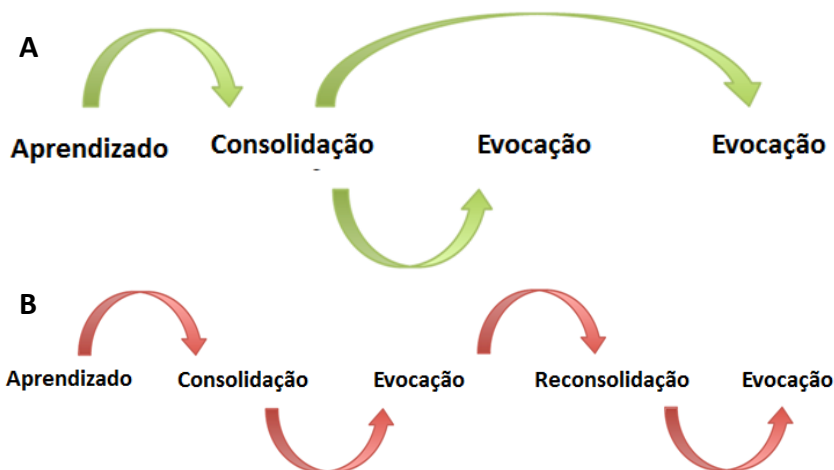


Figura 1: As duas visões da memória. Adaptado de Alberini & Ledoux (2013). A: Representação da ideia de que a memória após ser consolidada não poderia sofrer mais nenhuma transformação. Assim, cada evocação seria a evocação da memória original. B: Representação da teoria da reconsolidação que sugere que a cada evocação a memória pode ser modificada, sofrendo incorporações de novas informações, de forma que cada evocação não seria a lembrança da memória como formada originalmente.

Uma vez que os grandes achados da pesquisa clínica e pré-clínica sobre a reconsolidação ocorreram com base em estudos de memórias aversivas, automaticamente tornou-se claro que memórias formadas a partir de traumas poderiam ser “apagadas” através do uso de drogas que interferissem nesse processo. Por exemplo, o transtorno do estresse pós-

traumático, uma condição psiquiátrica derivada da formação de uma memória traumática, seria uma das patologias cujo alvo do tratamento poderia ser o bloqueio da reconsolidação. Assim, o fato de a reconsolidação existir não é um problema a ser debatido atualmente, mas o fato de como esse fenômeno de manutenção e atualização das memórias ocorre tem gerado um intenso tópico para debate (ALBERINI & LEDOUX, 2013).

1.4 Reconsolidação – quando, como e onde?

Como já mencionado, a reconsolidação pode ocorrer após a evocação de uma memória, mas como esse fenômeno acontece? Diversos mecanismos têm sido propostos para explicar a reconsolidação. Muitos deles são semelhantes aos mecanismos de consolidação, fato que faz com que alguns autores questionem se a reconsolidação seria apenas uma duplicação ou continuação da consolidação ou se apresentaria mecanismos específicos (DUDAI, 2006; ALBERINI, 2011, DUDAI, 2012).

Antes dos mecanismos translacionais e pós-translacionais é necessário que se cumpra um processo que desestabilize a memória original (KAANG, LEE & KIM, 2009), cujo nome foi cunhado de deconsolidação (MAREN, 2011). Esse passo depende da ativação de receptores CB1, canais de cálcio dependentes de tensão do tipo L e receptores NMDA contendo a subunidade NR2B, além da degradação de algumas proteínas sintetizadas no processo de consolidação dessa memória. Através desses mecanismos a memória torna-se lábil (SUZIKI *et al.*, 2004, 2008; KAANG, LEE & KIM, 2009).

Uma vez que a memória tornou-se lábil, uma nova onda de síntese proteica é requerida para que então a memória seja re-estabilizada e, portanto, reconsolidada (NADER, SCHAFE & LEDOUX, 2000). A partir de então, torna-se necessária a indução de genes de expressão imediata e ativação de algumas quinases, para fornecer a maquinaria necessária para a plasticidade sináptica que irá acontecer. Nesse contexto, já foi demonstrado a importância da indução de fatores de transcrição como o Zif268, Arc, CREB e NFkB em regiões como o HD e a ABL, sendo o Zif268 um marcador mais seletivo para a reconsolidação (LEE, EVERITT & THOMAS, 2004; DE LA FUENTE, FREUDENTHAL & ROMANO, 2011; KIM *et al.*, 2014). É importante ressaltar que a

expressão dessas e de outras proteínas varia de acordo com o protocolo experimental e a natureza da memória adotada.

A habilidade de atualizar a memória após a evocação sugere que esse evento representa uma oportunidade de renovação e modulação da plasticidade da memória original, além de oferecer uma ótima oportunidade para intervenções farmacológicas. Dessa maneira, agentes farmacológicos que interfiram com a síntese de algumas dessas proteínas, seja no sentido de aumentar (agonistas dos receptores adrenérgicos) ou de diminuir (benzodiazepínicos), irão modificar a memória original, fortalecendo ou enfraquecendo-a, respectivamente (BUSTOS, MALDONADO & MOLINA, 2006; GAZARINI *et al.*, 2013).

Após o estudo de Przybyslawski e Sara (1997), foi mostrado que a inibição da síntese proteica na ABL após a evocação da memória de medo condicionada ao som, prejudicava a reconsolidação de uma memória de 1 e 14 dias em ratos (NADER *et al.*, 2000). De maneira semelhante, foi demonstrada a importância do hipocampo dorsal na reconsolidação de memórias de medo frente ao contexto (LEE, EVERITT & THOMAS, 2004). De uma maneira interessante, essas áreas e mecanismos são necessários também para a consolidação da memória (MCGAUGH, 2000). E na busca por alvos farmacológicos que poderiam ser utilizados no tratamento do TEPT, uma vez que a terapia farmacológica para essa doença é bastante limitada (STEIN, IPSEY & SEEDAT, 2006), diversos grupos de pesquisa publicaram trabalhos mostrando o efeito de várias drogas sobre o bloqueio da reconsolidação. O midazolam, um modulador alostérico dos sítios benzodiazepínicos dos receptores GABA_A, mostrou-se efetivo em prejudicar a reconsolidação da memória de medo ao contexto (BUSTOS, MALDONADO & MOLINA, 2006; BUSTOS *et al.*, 2010), embora já se saiba que o uso dessa classe de fármacos é limitado devido aos mecanismos de tolerância e dependência que a mesma induz (ASHTON & YOUNG, 2003); o propranolol, um antagonista não seletivo dos receptores adrenérgicos do tipo beta, apresenta resultados contraditórios – alguns estudos demonstram que o mesmo bloqueia a reconsolidação em roedores (GAZARINI *et al.*, 2013), enquanto que outros não (MURAVIEVA & ALBERINI, 2010), embora quando testado em humanos seja eficaz (SCHWABE *et al.*, 2011; LONERGAN *et al.*, 2013); a clonidina, um agonista dos receptores alfa do tipo 2 bloqueia a reconsolidação da memória de medo ao contexto em ratos (GAMACHE *et al.*, 2012; GAZARINI *et al.*, 2013), embora ainda não

tenha sido testada em humanos; a rapamicina, um bloqueador da via da mTOR, também conhecida como sirolimus, bloqueia a reconsolidação da memória de medo em roedores (GAFFORD, PARSONS & HELMSTETTER, 2011) e se mostrou efetiva em um estudo piloto envolvendo veteranos de guerra (SURÍS *et al.*, 2013). Grande parte dos estudos realizados em roedores busca avaliar os efeitos comportamentais, sem investigar os mecanismos moleculares e os substratos neurais que a droga afeta, além de utilizarem drogas cuja limitação de uso em humanos já é conhecida (ex. toxicidade ou geração de tolerância/dependência).

No contexto dos mecanismos que sustentam a reconsolidação, alguns trabalhos tem mostrado a importância do sistema endocanabinoide, tanto que a ativação dos receptores CB1 é necessária para induzir a labilização da memória (SUZUKI *et al.*, 2008). Revisões recentes sugerem que o canabidiol (CBD), um fitocanabinoide presente na *Cannabis sativa*, é uma das drogas mais promissoras para ser utilizada no tratamento dos aspectos emocionais de diversos transtornos de ansiedade (CAMPOS *et al.*, 2012), embora os efeitos do CBD sobre a reconsolidação não tenham sido investigados até agora.

1.5 O sistema endocanabinoide

Apesar do termo “sistema endocanabinoide” ter apenas aproximadamente 30 anos (em 1994 e 1995 foi oficialmente assim denominado pelo grupo do pesquisador Vincenzo di Marzo), o uso dos derivados da *Cannabis sativa* não apenas para fins medicinais data de milênios (LI, 1973). É na farmacopeia Chinesa, a mais antiga que se tem notícia, que se encontram os primeiros registros dos efeitos psicofarmacológicos da maconha. Também na Índia, tanto o uso recreacional como o uso medicinal foram bastante difundidos. No entanto, foi apenas no século 19, através dos trabalhos do psiquiatra Jacques-Joseph Moreau, que a *Cannabis* tornou-se popular na Europa, sendo que o uso da maconha fumada tornou-se uma esperança para a cura de diversos males. Embora exista uma relação estreita entre a história da humanidade e o uso da *Cannabis sativa*, o conhecimento científico, tanto na área química como na farmacologia de seus compostos, datam das últimas cinco décadas. Foi na década de 60 do século passado, que o componente majoritário da planta, o Δ^9 -THC (THC; delta-9-tetraidrocanabinol), foi isolado, caracterizado e sintetizado (GAONI & MECHOULAN,

1964). Depois deste, mais de 60 compostos foram isolados, dentre eles o segundo componente em maior quantidade na planta, o canabidiol (CBD; MECOULAN & HANUS, 2000).

O sistema endocanabinoide compreende os receptores CB1 e CB2 e seus ligantes endógenos como a anandamida (AEA, agonista parcial) e o 2-aracdonilglicerol (2-AG, agonista total), além de enzimas de síntese e transportadores de membrana, e enzimas responsáveis pela sua degradação: a amida hidrolase de ácidos graxos (FAAH, *do inglês fatty acid amide hydrolase*) e a monoacilglicerídeo lipase (MAG-lipase), respectivamente (MUNRO *et al.*, 1993). Ambos receptores são acoplados à proteína $G_{i/o}$, sendo que a ativação de ambos reduz a atividade da adenilato ciclase, com a consequente redução nos níveis de AMPc. Os receptores CB1 estão localizados preferencialmente na pré-sinapse de neurônios glutamatérgicos ou GABAérgicos dependendo do tecido e da região encefálica, a consequência funcional da ativação CB1 é a redução da excitabilidade neural e a redução da liberação de neurotransmissores induzida por despolarização (HOWLETT, 2002). Já os receptores CB2, expressos em menor quantidade no sistema nervoso central, apresentam-se particularmente em regiões pós-sinápticas, no corpo celular de neurônios e em microglias (ONAIWI *et al.*, 2006).

Hoje se sabe que o CB1 é o receptor acoplado à proteína G mais abundante no cérebro de mamíferos e que estão amplamente expressos em regiões como o hipocampo, amígdala e o córtex PL, além de outras estruturas encefálicas que também desempenham papéis fundamentais para o processamento da memória, incluindo a etapa de reconsolidação (HERKENHAN *et al.*, 1990).

1.6 O canabidiol

O canabidiol foi primeiramente isolado entre 1930 e 1940, e sua estrutura elucidada em 1963 (Fig. 2), mas nenhum trabalho farmacológico foi realizado até 1970. No início dos anos 70 surgiram os primeiros trabalhos demonstrando o efeito anticonvulsivante do CBD em camundongos e ratos (CARLINI *et al.*, 1973; IZQUIERDO *et al.*, 1973). Nos anos 80 foi observado que o CBD produz efeitos ansiolíticos em roedores e em humanos (ZUARDI *et al.*, 1982; GUIMARAES *et al.*, 1990; ZUARDI *et al.*, 1993).

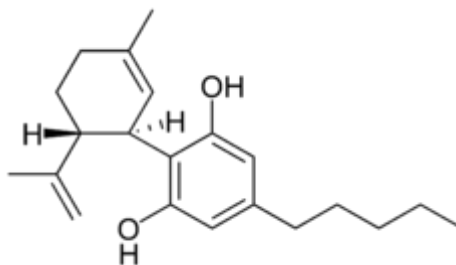


Figura 2: estrutura química do canabidiol.

Posteriormente, outros efeitos foram encontrados, entre eles efeitos do tipo antipsicótico, anti-inflamatório, neuroprotetor, hipnótico, sedativo, antiemético, entre outros (MECHOULAM, PARKER & GALLILY, 2002). Mais recentemente foi demonstrado que o CBD facilita a extinção de memórias aversivas tanto em ratos como em humanos (BITTENCOURT, PAMPLONA, TAKAHASHI, 2008; DAS *et al.*, 2013; DO MONTE *et al.*, 2013)

Já foi demonstrado que diferentes regiões encefálicas medeiam os efeitos emocionais do CBD. Em humanos, o CBD altera a atividade do córtex cingulado anterior, dos núcleos da amígdala e reduz a conectividade entre o córtex pré-frontal e as regiões subcorticais (CRIPPA *et al.*, 2004; FUSAR – POLI *et al.*, 2009). Em roedores, já foi demonstrado que a microinjeção de CBD na substância cinzenta periaquedutal promove um efeito ansiolítico no labirinto em cruz elevado, labirinto em T elevado e no teste de conflito de Vogel (CAMPOS & GUIMARAES, 2008; GOMES *et al.*, 2012). Nessa mesma região, o CBD também reduz os comportamentos de pânico causados pela estimulação elétrica (SOARES *et al.*, 2010). O leito da estria terminal e o córtex pré-frontal medial (CPFm) também são importantes para o efeito do tipo ansiolítico do CBD (LEMOS, RESSTEL & GUIMARAES, 2010; GOMES, RESSTEL & GUIMARAES, 2011). Já se sabe que a redução da expressão do comportamento de congelamento no condicionamento de medo ao contexto após a administração sistêmica de CBD depende da atividade do córtex PL, uma região do CPFm. E que no infralímbico (IL), uma parte do CPFm ventral ao PL, o CBD produz um efeito oposto (LEMOS, RESSTEL & GUIMARAES, 2010).

O CBD produz esses efeitos através de um amplo espectro de ação (IZZO *et al.*, 2009).

Trabalhos *in vitro* e *in vivo* sugerem que o CBD aumenta os níveis de AEA (BISOGNO *et al.*, 2001; LEWEKE *et al.*, 2012). No entanto, o efeito ansiolítico do CBD não é bloqueado pelo AM251, um antagonista dos receptores CB1. Esse efeito é bloqueado pela antagonista dos receptores de serotonina do tipo 5-HT_{1A} (RUSSO *et al.*, 2005; CAMPOS *et al.*, 2012).

Com relação aos efeitos sobre a extinção da memória, foi demonstrado que esse efeito do CBD é mediado pelos receptores CB1, uma vez que o antagonista SR141716A bloqueou a facilitação da extinção (BITTENCOURT, PAMPLONA & TAKAHASHI 2008). Além desses mecanismos, tem sido demonstrado que o CBD também pode atuar como um agonista inverso dos receptores CB1 e CB2 (THOMAS *et al.*, 2007) e produzir efeitos através dos receptores vaniloides do tipo 1 (TRPV1; BISOGNO *et al.*, 2001).

O fato de o CBD apresentar essa diversidade de efeitos farmacológicos e de ser desprovido de efeitos psicotomiméticos (BHATTACHARYYA *et al.*, 2009), tanto em roedores como em seres humanos, faz com que essa seja uma droga com potencial para uso clínico no tratamento dos transtornos de estresse e de ansiedade (CAMPOS *et al.*, 2012).

Como já exposto anteriormente, um dos principais substratos neurais do CBD em humanos e roedores é o CPF. Por suas conexões com o hipocampo e com a amígdala, sugere-se que o CPFm também seja importante para o controle da reconsolidação na memória e para os possíveis efeitos amnésicos do CBD (KOWAL *et al.*, 2013). No entanto, permanece por ser investigado se o CBD produz algum efeito sobre a reconsolidação de uma memória aversiva, bem como o papel do CPFm nesse processo.

1.7 Córtex pré-frontal medial

O CPFm pertence a uma região maior denominada de neocórtex. Como o nome sugere, é a região mais nova ou recente do cérebro, sendo o substrato biológico das habilidades mentais dos mamíferos. Embora tenha origem nos répteis (NORTHCUTT, 1981; STRIEDTER, 2005), sua organização em 6 lâminas contendo neurônios radialmente dispostos surgiu pela primeira vez em pequenos mamíferos (RAKIC, 2009). O córtex cerebral de todos os mamíferos é composto por uma camada celular de projeção, os neurônios piramidais, e circuitos neuronais locais, formado por interneurônios dispostos em lâminas horizontais, intersectado por

colunas verticais que estão interconectadas na dimensão vertical e compartilham uma conectividade extrínseca (fig. 3; GOLDMAN – RAKIC, 1987; MOUNTCASTLE, 1995). Essa aparente uniformidade citoarquitetônica varia de acordo com a função de cada área do córtex (RAKIC, 2009). De fato, estudos recentes sugerem que de um ponto de vista funcional, as diferenças citoarquitetônicas do córtex podem não serem tão importantes quanto a distribuição das fibras aferentes, a conectividade interna e o destino das fibras eferentes (FUSTER, 2008).

As primeiras descrições dos efeitos comportamentais derivados da ablação do CPF de animais datam de 1874, quando Hitzig concluiu que o CPF seria o substrato da inteligência, enquanto Ferrier (1886), comparando os efeitos da ablação e da estimulação elétrica de certas porções do córtex, observou que o mesmo era necessário para a atenção. O primeiro a analisar sistematicamente os efeitos da ablação do CPF em diversas espécies foi Bianchi (1895, 1922), concluindo que esta área seria o centro associativo e perceptivo do encéfalo. Posteriormente, Pavlov (1949) enfatizou a importância do CPF na integração do movimento direcionado a um objetivo e o comportamento.

Homólogo ao córtex cingulado anterior de primatas (MCDONALD 1998; STEFANACCI & AMARAL 2002), o CPFm é dividido em três principais regiões: o CC, o PL e o IL (HOOVER & VERTES, 2007; Fig. 3), sendo essas três sub-regiões importantes controladores dos comportamentos de medo (HEIDBREder & GROENEWEGEN, 2003).

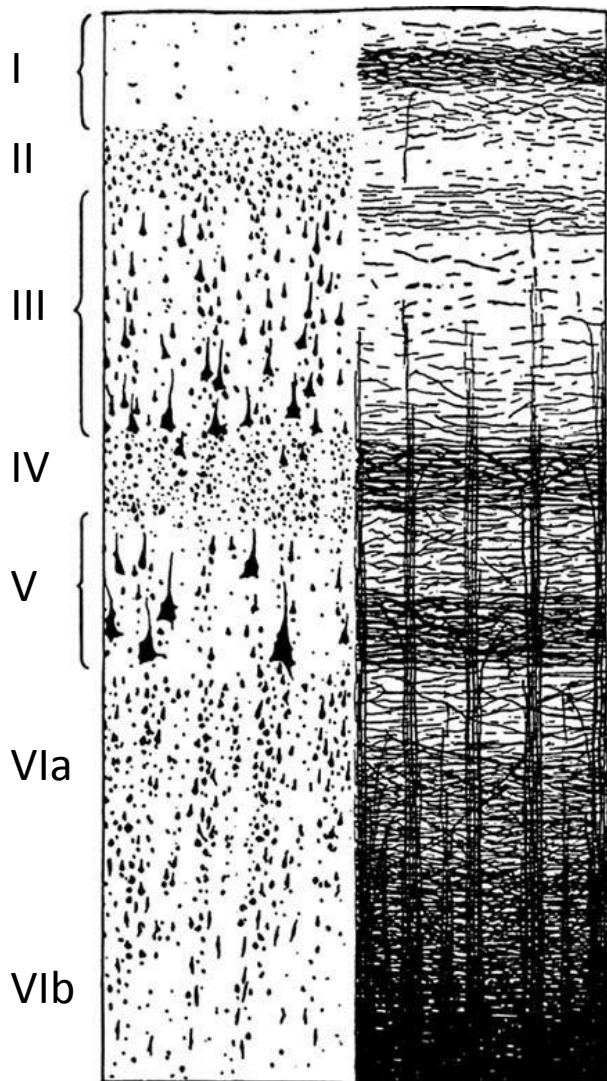


Figura 3: estrutura citoarquitetônica do córtex. De I a VIb, a representação de cada camada. Adaptado de Fuster (2008).

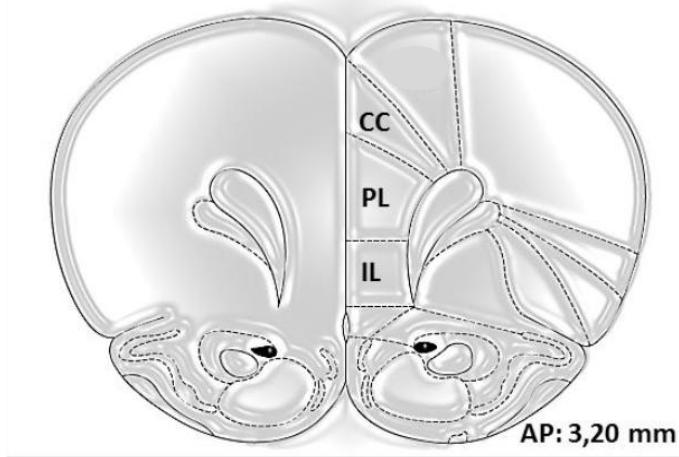


Figura 4: Representação esquemática das porções do córtex pré-frontal medial de ratos em um corte coronal. CC: córtex cingulado; PL: córtex pré-límbico; IL: córtex infralímbico; AP: ântero-posterior. Adaptado de Paxinos e Watson, 2009.

Essas três subdivisões conectam-se entre si, sendo as conexões entre o CC e o PL mais densas do que de ambos com o IL (HOOVER & VERTES, 2007). Além disso, o PL recebe projeções da camada CA1 do hipocampo e envia, bem como recebe, projeções excitatórias para o núcleo basolateral da amígdala (VERTES, 2004; HOOVER & VERTES, 2007). O IL projeta-se para os núcleos da amígdala através de sinapses com as células intercaladas da amígdala, as quais são neurônios GABAérgicos e, portanto, inibitórios (fig. 5). Dessa maneira, enquanto o CC e o PL estimulam a atividade da amígdala “ativando o medo”, a atividade do IL faria o papel de “desativar os comportamento de medo” (PETERS, KALIVAS & QUIRK, 2009). Já foi demonstrado em ratos e camundongos que o aumento da atividade do IL está relacionado com a facilitação da extinção e redução do medo (BURGOS - ROBLES, VIDAL – GONZALEZ & QUIRK, 2009; PETERS, KALIVAS & QUIRK, 2009). E de maneira oposta, o aumento da atividade do PL aumenta a expressão de comportamentos de medo e dificulta a extinção (BURGOS- ROBLES, VIDAL – GONZALEZ & QUIRK 2009). Enquanto que a inativação dessa região ou o bloqueio de alguns receptores, como os adrenérgicos do tipo beta ou CB1 reduz os

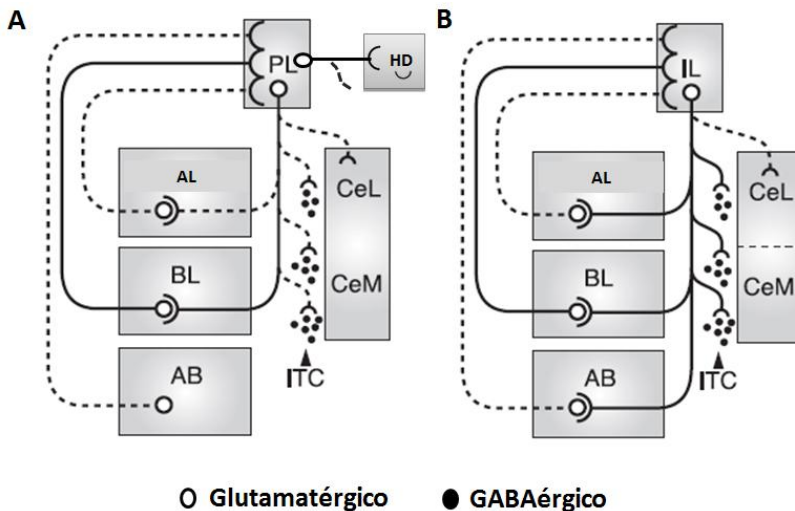


Figura 5: Conexões entre córtex pré-frontal medial (pré-límbico: PL e infralímbico: IL), amígdala (lateral: AL, basolateral: BL e núcleo acessório basal: AB) e hipocampo (hipocampo dorsal: HD). As linhas cheias indicam projeções mais densas. As linhas pontilhadas indicam as projeções mais fracas. O córtex PL envia densas projeções excitatórias para a BL, a qual estimula a amígdala central (CeL e CeM) aumentando o medo. Ainda, o PL envia poucas projeções para as células intercaladas da amígdala (ITC), as quais são interneurônios GABAérgicos que inibem a atividade de CeL e CeM. O córtex IL envia densas projeções para a ITC, inibindo a CeL e CeM, reduzindo o medo. Também, através das conexões com amígdala e HD, o PL recebe as informações contextuais.

comportamentos relacionados à ansiedade e ao medo (STERN *et al.*, 2010; LEMOS, RESSEL & GUIMARAES, 2010; SIERRA – MERCADO *et al.*, 2011).

Apesar das densas conexões do córtex PL com o hipocampo dorsal e com a amígdala, apenas recentemente tem se olhado para essa região como um possível substrato neural da formação de memórias de medo. Através da estimulação da região CA1 a LTP é induzida no córtex PL (LIM *et al.*, 2010; SAKATA *et al.*, 2013). Além disso, as conexões do CPFm com o hipocampo são necessárias para o armazenamento da memória espacial: lesões no CPFm alteram a atividade das células de lugar (KENTROS *et al.*, 2004).

Na consolidação de memórias aversivas, foi demonstrado que o bloqueio dos receptores de BDNF no PL prejudica a consolidação da memória condicionada ao som e apetitiva (CHOI *et al.*, 2012) e que a inibição da síntese proteica no CC prejudica a consolidação e a reconsolidação da memória de medo ao contexto em ratos (EINARSSON & NADER, 2012). Além de participar da consolidação, também já foi demonstrada a importância do córtex PL para a evocação de memórias aversivas em ratos (GONZALEZ *et al.*, 2013).

Apesar do córtex PL de ratos ser homólogo ao córtex cingulado anterior de humanos, (MCDONALD 1998; STEFANACCI & AMARAL 2002), o qual tem uma função similar de manter a memória aversiva original (KLAVIR *et al.*, 2012) e comumente está hiperativo no TEPT (FANI *et al.*, 2012; PITMAN *et al.*, 2012; ADMON, MILAD & HENDLER, 2013), o papel do córtex PL na reconsolidação ainda não foi investigado.

1.8 O transtorno do estresse pós-traumático

O TEPT é um transtorno de ansiedade que pode acometer indivíduos que passaram por situações que ameaçam a continuidade da vida ou que causem sérios danos à saúde, gerando uma resposta intensa de medo, desamparo ou horror. Pacientes com TEPT reexperenciam a situação traumática de diversas maneiras, incluindo pensamentos intrusivos em relação ao trauma, pesadelos, *flashbacks* e reações fisiológicas, quando em situações que relembram o trauma (HUGHES & SHIN, 2008).

A neurocircuitaria comprometida no TEPT envolve a porção medial do CPF, a amígdala e o hipocampo, sendo que a amígdala estaria hiper-responsiva em relação ao hipocampo e ao CPFm (HUGHES & SHIN, 2011). Acompanhando o desbalanço dessa circuitaria, sabe-se que ocorre uma hiperativação do sistema noradrenérgico em relação ao endocanabinoide e ao glicocorticoide (BAILEY *et al.*, 2013). De fato, recentemente foi demonstrado que pacientes com TEPT apresentam uma redução nos níveis de AEA e um aumento na expressão de receptores CB1, fato que explicaria parcialmente o aumento da ansiedade nesses pacientes (HILL *et al.*, 2013; NEUMEISTER, 2013).

Apesar da visão hipofuncional do CPFm em humanos com TEPT ser bem aceita (HUGHES & SHIN, 2011), alguns estudos mais recentes demonstram uma hiperativação do córtex cingulado anterior de humanos com TEPT (ADMON, MILAD & HENDLER,

2013; HERRINGA *et al.*, 2013; PITMAN *et al.*, 2012), uma discrepância que poderia ser justificada pelo uso de diferentes técnicas de imagem. O aumento da atividade do córtex cingulado anterior de humanos está relacionado com um aumento na condutância da pele, um índice de ansiedade em humanos, taquicardia e estados subjetivos de medo. Além disso, essa região está associada com a avaliação do significado interno e externo do estímulo aversivo (ETKIN, EGNER & KALISH, 2011).

Como consequência dessas alterações, os pacientes com TEPT apresentam prejuízos cognitivos, como a dificuldade de extinguir a memória traumática; e emocionais, como o aumento da ansiedade e depressão, entre outros problemas. Dessa maneira, sugere-se que interferir com a reconsolidação da memória traumática nesses pacientes seja uma maneira mais eficaz de aliviar esses sintomas (SCHILLER & PHELPS, 2011). Porém, para conseguirmos chegar nesse objetivo, muito trabalho no sentido de entender a neurobiologia e circuitaria da reconsolidação, bem como, para descobrir drogas que sejam seguras e que prejudiquem a mesma permanece por ser realizado.

2. Hipótese

Considerando a importância do sistema endocanabinoide na reconsolidação de memórias aversivas e a alta expressão dos receptores canabinoides no córtex pré-límbico, a hipótese do presente trabalho é que o canabidiol, através de uma ação nos receptores canabinoides do tipo 1 presentes no córtex pré-límbico prejudica a reconsolidação da memória de medo ao contexto.

3. Objetivo geral

O objetivo geral do presente trabalho foi avaliar o efeito do canabidiol sobre a reconsolidação da memória de medo ao contexto, bem como o papel do córtex pré-límbico sobre a reconsolidação e o efeito do canabidiol.

3.1 Objetivos específicos

- Padronizar o protocolo de condicionamento de medo ao contexto;
- Padronizar o protocolo de reconsolidação da memória de medo ao contexto;
- Realizar a curva dose – efeito do CBD sobre a reconsolidação;
- Avaliar o mecanismo de ação do CBD sobre a reconsolidação;
- Avaliar se o efeito do CBD sobre a reconsolidação é duradouro;
- Avaliar se a memória prejudicada pelo CBD sofre reinstalação;
- Avaliar o efeito do CBD sobre a reconsolidação de uma memória mais antiga;
- Avaliar a expressão do Zif268 no CPFm após a evocação da memória de medo ao contexto;
- Avaliar o efeito do CBD sobre a expressão de Zif268 no CPFm após a evocação da memória de medo ao contexto;
- Avaliar o papel do córtex PL sobre a reconsolidação de memórias com diferentes idades;
- Avaliar se o efeito da inativação do córtex PL é duradouro;
- Avaliar se a memória prejudicada pela inativação do córtex PL sofre reinstalação;
- Avaliar a participação do córtex PL na reconsolidação de memórias mais antigas;
- Avaliar o mecanismo de ação central do CBD;

- Avaliar o efeito da inibição da degradação de anandamida no córtex PL sobre a reconsolidação da memória de medo ao contexto.

4. Material e Métodos

4.1 Animais

Foram utilizados ratos *Wistar* machos, pesando entre 320 – 350 g, com 14 – 16 semanas de idade. Os animais foram mantidos em grupos de quatro a cinco por caixa (50 x 30 x 15 cm), com ciclo claro/escuro de 12 horas (luzes acendem as 7:00 AM) e receberam comida e água *ad libitum*. Os testes comportamentais ocorreram durante a fase clara (1:00 – 5:00 PM). Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética para o uso de animais de laboratório da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA/UFSC 23080.016341/2010-30) de acordo com a Sociedade Brasileira de Neurociência e Comportamento.

4.2 Drogas

O midazolam (MDZ; Cristália, Brasil), um modulador alostérico positivo dos receptores GABA_A, foi diluído em solução salina (NaCl 0,9 %) e administrado sistemicamente em uma dose amnésica (1,5 mg/kg; BUSTOS *et al.*, 2006) para a padronização do protocolo experimental de reconsolidação da memória aversiva.

O canabidiol (CBD; THC-Pharma, Alemanha), um componente da *Cannabis sativa* foi dissolvido em NaCl 0,9 % contendo 5 % de monooleato de polioxietilenosorbitol (Tween 80; Vetec, Brazil) para avaliação do efeito amnésico. Para tanto, uma curva dose-efeito foi realizada (3, 10 e 30 mg/kg).

AM251 (Tocris, EUA), um antagonista dos receptores canabinoides do tipo 1 (CB1), dissolvido em solução de NaCl 0,9 % contendo 5 % de Tween 80, foi utilizado sistemicamente e intra-córtex PL em doses subefetivas (1 mg/kg e 50 pmol/0,2 µL/sítio de injeção, respectivamente) (CASAROTTO *et al.*, 2010; DE OLIVEIRA ALVARES *et al.*, 2008) no intuito de verificar o mecanismo de ação do efeito amnésico do CBD.

URB597 (Cayman, EUA), um inibidor da enzima de degradação de anandamida, a FAAH, foi dissolvido em PBS (tampão fosfato salina) contendo 20 % de dimetil sulfóxido (DMSO) formando uma solução de 200 pmol/0,2 µL. A partir dessa solução foi feita uma diluição com PBS para obtermos a solução de 30 pmol/0,2 µL (MCLAUGHLIN *et al.*, 2012).

WAY100635 (Sigma, EUA), um antagonista dos receptores de serotonina do tipo 5-HT_{1A}, foi dissolvido em NaCl 0,9%. A dose utilizada foi de 0,1 mg/kg (RESSTEL *et al.*, 2009).

Muscimol (MUS; Sigma, EUA), uma droga que potencializa a transmissão GABAérgica, foi utilizado no intuito de inativar temporariamente a transmissão sináptica da porção pré-límbica do córtex pré-frontal medial. A dose utilizada foi de 4,0 nmol/0,2 µL/sítio de injeção (SHAH *et al.*, 2004) e dissolvida em PBS.

Com exceção do muscimol e o AM251, quando administrado intra córtex PL, todas as soluções foram preparadas imediatamente antes do uso e administradas por via intraperitoneal (i.p.) em um volume de 1,0 ml/kg.

4.3 Cirurgia estereotáxica

Os animais foram anestesiados com xilazina 10 mg/kg/mL (Laboratórios Calier Ltda, Brasil) e quetamina 100 mg/kg/mL (Sespo Ind. Com. Ltda., Brasil). Após a indução de anestesia, 2,5 mg/kg (s.c.) de flunixinmeglumina, um agente analgésico com atividade anti-inflamatória e antipirética foi administrado. Os animais foram então adaptados em um aparelho estereotáxico (Stoelting, EUA) e a limpeza do campo cirúrgico foi realizada com uma solução contendo iodo a 2 %. Na região da incisão foi administrado o anestésico local cloridrato de lidocaína 3 % associado ao vasoconstritor noradrenalina 1:50.000 (Dentsply Pharmaceutical, Brasil). Uma incisão longitudinal foi realizada alguns minutos após para expor a calvária e remover o periósteo por raspagem. Na sequência, dois orifícios foram perfurados, com uma broca odontológica acoplada a um mini-motor de suspensão, para a fixação de dois micro-parafusos de aço inoxidável, que serviram de âncora para a prótese de acrílico disposta no crânio do animal. Outro orifício foi perfurado para a introdução de duas cânulas-guia dirigidas a porção pré-límbica ou infralímbica do córtex pré-frontal medial, sendo as coordenadas obtidas do Atlas do cérebro de rato elaborado por Paxinos e Watson (2009): Interaural - IA: + 11,8 mm, lateral L: ± 0,6 mm e dorso-ventral - DV: - 1,8 mm. As cânulas-guia (tamanho de 11 mm) foram confeccionadas a partir de agulhas (25,0 x 7,0 mm), através das quais as drogas foram administradas. As cânulas-guia foram fixadas na calota craniana por meio de uma resina acrílica autopolimerizável. Por fim, um mandril de aço inoxidável foi colocado em cada uma das cânulas-guia para evitar o entupimento das mesmas. Após a cirurgia os animais retornaram ao biotério setorial onde permaneceram alojados em

grupos de 3 - 4 por caixa (50 x 30 x 15 cm) até a realização dos experimentos.

4.4 Microinjeção central

Dez dias após a realização da cirurgia estereotáxica, os animais receberam uma injeção intracerebral por meio de uma agulha odontológica (PL: 13,6 mm; IL: 14,0 mm) inserida pelas cânulas-guia até atingir a região alvo de cada etapa experimental. As agulhas foram conectadas a micro-seringas de 5,0 μ L por meio de tubos de polietileno. Para o controle do volume e do tempo de injeção da droga uma bomba de infusão digital foi utilizada, sendo que a taxa de infusão das drogas foi de 0,2 μ L/min/lado.

Após o término dos testes comportamentais, os animais foram anestesiados e, através das cânulas-guias, receberam 0,2 μ L/lado do corante azul de Evans (1,0 %) e foram submetidos à perfusão intracardíaca com salina e formalina (10 %). Por fim, os cérebros foram retirados, fixados em formalina 10 % e cortados posteriormente em secções com 50 μ m de espessura em um criostato para que os sítios de injeção fossem identificados histologicamente (fig. 6). Foram incluídos na análise estatística somente os animais que apresentarem os sítios de microinjeção destas drogas no córtex PL e no IL.

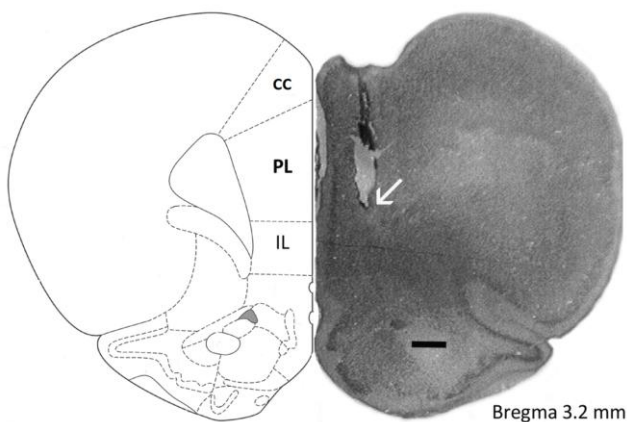


Figura 6: Desenho esquemático de um corte coronal do cortex pré-frontal medial de ratos (escala da barra = 500 μ m) mostrando suas principais sub-regiões – o córtex cingulado (CC), pré-límbico (PL) e infralímbico (IL) e o sítio de infusão das drogas (indicado pela seta) no córtex PL.

4.5 Condicionamento de medo ao contexto e reconsolidação

Antes do início de cada sessão, os animais foram mantidos em uma sala adjacente à sala de condicionamento, por pelo menos trinta minutos. Inicialmente, os animais foram submetidos a uma sessão de familiarização em uma caixa (Contexto A; 35 cm x 20 cm x 30 cm) construída de alumínio, com a parede frontal e teto feitos de acrílico. O piso gradeado, feito com barras de metal inoxidável (3 mm de diâmetro e afastadas 0,9 mm centro a centro), é conectado a uma placa de circuitos (Insight, Ch 2001, Brasil), a qual permite que os choques sejam programados em intensidade e tempo e disparados de acordo com o protocolo experimental (fig. 8). No dia do condicionamento, ou sessão de treino, os animais foram colocados no Contexto A (estímulo condicionado – EC) e, após 30 s receberam 3 choques nas patas (estímulo incondicionado – EI; 0,7 mA/3 s, em animais sem cirurgia e 0,8 mA/3 s, em animais operados). O intervalo entre cada choque foi de 30 s e após o término do último choque os animais permaneceram por mais 30 s na caixa, sendo o tempo total dessa sessão 2 minutos. O protocolo adotado foi considerado um protocolo de treino forte, caracterizado por uma expressão de congelamento maior do que 50 % durante a etapa de evocação. Os animais que não atingiram esse nível foram excluídos da análise.

Um dia após o condicionamento foi realizada a evocação da memória de medo contextual. A evocação da memória consistiu na re-exposição do animal apenas ao Contexto A, sem a presença do EI, por 3 minutos, de acordo com trabalhos que evidenciam que para induzir a a labilização e reconsolidação, mas não a extinção da memória, são necessárias sessões curtas de evocação (BUSTOS *et al*, 2006). Durante a evocação da memória, a porcentagem de tempo de congelamento (caracterizado pela ausência completa de movimentos, exceto àqueles necessários para respiração) foi registrada e utilizada como parâmetro de retenção de memória, de acordo com o protocolo experimental (fig. 9). Para avaliarmos o efeito dos tratamentos sobre a janela temporal de reconsolidação, os tratamentos farmacológicos foram realizados imediatamente, ou 6 horas após a evocação.

Um ou sete dias após a evocação, os animais foram re-expostos ao Contexto A para avaliarmos o efeito do tratamento farmacológico (Teste A). Novamente, a porcentagem de congelamento foi avaliada. No dia seguinte os animais foram expostos a um contexto neutro (30 x 30 x 30 cm; Teste B) para avaliarmos a ocorrência de generalização, um fenômeno que ocorre devido à intensidade do treino e caracterizado pela

expressão de respostas de medo frente a ambientes neutros (GAZARINI *et al.*, 2013). Após o término de cada etapa os animais retornaram ao biotério setorial.

4.6 Extinção da memória de medo ao contexto

O protocolo de extinção de memória consistiu da exposição dos animais ao Contexto A, por 10 ou 15 minutos, tempos necessários para causar uma redução significativa no tempo de congelamento.

4.7 Reinstalação da memória de medo ao contexto

A reinstalação da memória consistiu da exposição dos animais a uma caixa (40 x 25 x 30 cm) denominada de Contexto C (fig. 12), diferente do A e do B. Essa caixa é construída de alumínio, com a parede frontal e teto feitos de acrílico. O piso gradeado, feito com barras de metal inoxidável (3 mm de diâmetro e afastadas 0,9 mm centro a centro), é conectado a uma placa de circuitos (Insight, Ch 2001, Brasil), que permite que os choques sejam programados em quantidade, intensidade e duração.

Além das dimensões serem maiores do que as do Contexto A, o Contexto C teve suas paredes modificadas. Na parede lateral foi colada uma borracha preta e circular e na parede posterior foram feitas listras brancas com fita adesiva. Após trinta segundos de exposição ao Contexto C os animais receberam 1 choque leve nas patas (0,3 mA/3 s). Após 30 segundos os animais foram retirados da caixa e retornaram para o biotério setorial.

4.8 Preparo das amostras para imunohistoquímica

Uma vez que o pico de expressão de Zif268 ocorre após 60 minutos (TSÉ *et al.*, 2011), uma hora após a evocação da memória, ou após serem expostos ao contexto neutro para não evocarem a memória, os animais foram anestesiados com cloral hidratado 15% (2.5 ml/kg, i.p.) e xilazina (10 mg/ml/kg, i.p.) e submetidos à perfusão transcardíaca com solução de sacarose 9,25 % (250 ml/rato) seguida de uma solução de paraformaldeído 4 % em tampão fosfato salina 0,1 M (PBS 0,1 M; pH 7.4; PFA 4 %; 250 ml/rato), ambas a 4 °C. Os encéfalos foram retirados e deixados em PFA 4 % por 24 horas, para então serem transferidos para uma solução de sacarose a 20 %. Cortes seriados de 40 µm (5 cópias) foram obtidos em um criostato (Leica CM 1850,

Alemanha) e mantidos em solução anticongelante (propileno glicol 32,6 % e sacarose 18.7% em PBS) para posterior processamento.

4.9 Imunohistoquímica para Zif268

As secções foram pré-tratadas inicialmente com H₂O₂ 1,0 % em metanol durante 30 minutos, para redução da atividade da peroxidase endógena. Após 3 lavagens, de 5 minutos cada, em PBS contendo 0,15 % de Triton - X100 (PBS-X), as secções foram incubadas em soro albumina bovina (BSA) 1,0 % em PBS-X durante 20 minutos, para bloqueio dos sítios de ligações inespecíficas. Em seguida, as secções foram incubadas com o anticorpo primário policlonal de coelho anti-Zif268 (1:800 em BSA 1 %; Santa Cruz Biotechnology, EUA) a 4 °C *overnight*. Após a incubação, as secções foram novamente lavadas em PBS-X (3 x 5 minutos) antes de serem incubadas com o anticorpo secundário biotilado (1:200 em PBS-X; IgG cabra anti-coelho; Santa Cruz Biotechnology, EUA) por 90 minutos. Após remover o anticorpo secundário, as secções foram lavadas com PBS-X (3 x 5 minutos) e incubadas com o complexo ABC avidina-biotina-peroxidase (1:500 em PBS-X; Vector Laboratories, EUA) por 2 horas. A revelação (5 – 10 min) foi feita utilizando uma solução de tetracloreto de 3'3'-diaminobenzidina (DAB 0,02 %, Sigma Aldrich, EUA) contendo 0,03 % de sulfato de níquel hexahidratado e cloreto de amônio. Finalmente, após serem lavadas adequadamente, as lâminas foram desidratadas através de uma série de álcoois (70, 90 e 100 %; 1 – 1:30 min), clareadas no xilol (1 x 5 min; 2 x 20 min) e cobertas com DPX (D.P.X. *mountant for histology*, Sigma Aldrich, EUA) e lamínulas.

4.9.1 Regiões de interesse e quantificação do Zif268

Três secções do córtex pré-frontal medial (3,2 – 2,2 mm anterior ao bregma) foram selecionadas utilizando uma objetiva de 10 x do microscópio Eclipse 50i (Nikon, EUA) equipado com uma câmera digital. Foram obtidas imagens de 0,46 mm² do CC, PL e IL, e apenas os núcleos pretos e ovais foram quantificados com o auxílio do *software* ImageJ (EUA). Cada encéfalo analisado foi quantificado em triplicata e a média foi calculada. Os resultados foram expressos como o número de células positivas para o Zif268/Egr1 por 0,1 mm².

4.9.2 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M.). Após verificar a normalidade, os grupos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) com medidas repetidas para avaliação da porcentagem de tempo de congelamento no Contexto A (sessão de evocação, Teste A, Teste A₁, Teste A₂, sessão de extinção e sessão de reinstalação); ANOVA de uma via para avaliação da porcentagem de tempo de congelamento no Contexto B (Teste B); ANOVA de uma via com medidas repetidas para avaliação da porcentagem de tempo de congelamento no Contexto B (Teste B₁ e Teste B₂); ANOVA de duas vias com medidas repetidas para avaliação da porcentagem de tempo de congelamento no Contexto A (Teste A₁ e Teste A₂) nos experimentos de mecanismo de ação; ANOVA de duas vias para avaliação do número de células positivas para o Zif268/Egr1. Quando a ANOVA revelou uma interação significativa entre as variáveis independentes, os valores de F dos efeitos principais foram omitidos. Foi utilizado o teste de *post-hoc* de Newman-Keuls foi utilizado. Os dados foram considerados estatisticamente diferentes quando o valor de $P < 0,05$.

4.9.3 Protocolo experimental

Em todos os experimentos os animais foram familiarizados, condicionados no Contexto A. Nesse mesmo contexto a memória foi evocada e o Teste A foi realizado. Quando houve a necessidade de omitir a evocação da memória, os animais foram expostos ao Contexto B, o qual também foi utilizado para avaliarmos a generalização. Nos experimentos de reinstalação da memória, uma terceira caixa foi utilizada (Contexto C). O momento de administração das drogas ocorreu sempre após a evocação da memória.

Os experimentos foram compostos pelas seguintes etapas:

- **Familiarização:** a sessão de familiarização consistiu da exposição dos animais ao Contexto A (fig. 7) por 3 minutos sem a presença do EC. Essa etapa esteve presente em todos os experimentos e nenhum comportamento foi mensurado.



Figura 7: Contexto A.

- **Sessão de treino:** a sessão de treino ocorreu 24 horas após a familiarização e consistiu da exposição dos animais ao Contexto A onde os animais receberam 3 choques nas patas na intensidade de $0,7 \text{ mA}/3 \text{ s}$ (fig. 8). Essa etapa esteve presente em todos os experimentos e nenhum comportamento foi mensurado.

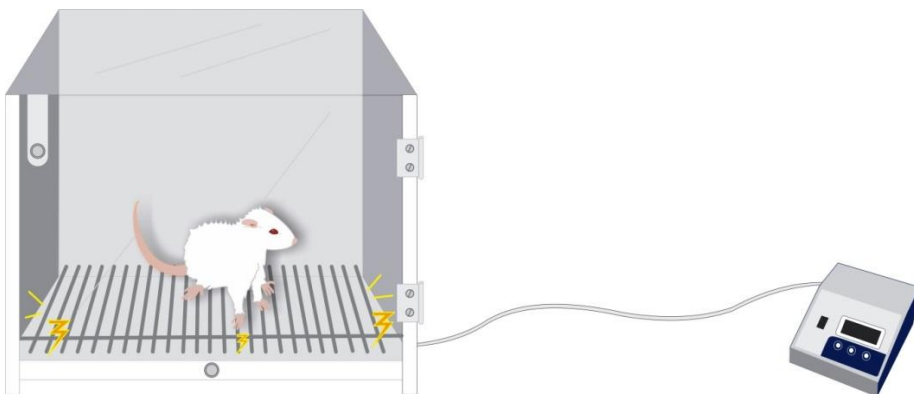


Figura 8: Contexto A adaptado ao gerador de choque.

- **Sessão de evocação:** a sessão de evocação da memória correu 24 horas após a sessão de treino, com exceção do experimento 5 e 10 em que ocorreu 7 e 21 dias após a sessão de treino. A sessão de evocação consistiu de uma exposição curta (3 minutos) ao Contexto A na ausência do EI (fig. 9A). O comportamento de congelamento foi mensurado. Nos

experimentos 1B e 8 não houve a evocação da memória, assim, os animais foram expostos a um contexto neutro – Contexto B (fig. 9B) por 3 minutos. O comportamento de congelamento foi mensurado.

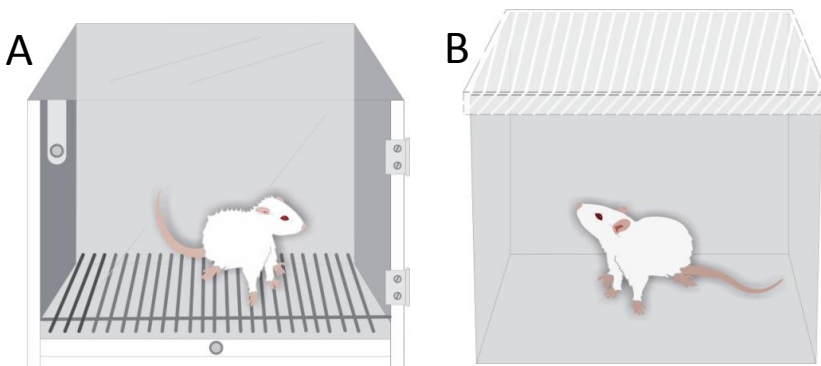


Figura 9: A: Contexto A – sessão de evocação da memória. B: Contexto B – sessão na qual a memória não é evocada.

- **Teste A:** o Teste A (fig. 10) correu 24 horas após a sessão de evocação em todos os experimentos, com exceção dos experimentos 3 e 9, onde ocorreu 7 e 10 dias após, respectivamente. Também nos experimentos 3 e 9 houve uma segunda exposição ao Teste A, denominada de Teste A₂. O Teste A consistiu da exposição dos animais no Contexto A, na ausência do EI, por 3 minutos para avaliação do comportamento de congelamento. Nos experimentos 1B e 8, o Teste A ocorreu 24 horas após a exposição dos animais ao Contexto B. No experimento 7 não aconteceu o Teste A.
- **Sessão de extinção:** a sessão de extinção (fig. 11) ocorreu 24 horas após o Teste A e nos experimentos 4 e 9. Consistiu da exposição dos animais a uma sessão de 10 e 15 minutos ao Contexto A, respectivamente. O comportamento de congelamento foi analisado.



Figura 10: Cotexto A – Teste A



Figura 11: Cotexto A – Extinção da memória

- **Sessão de reinstalação da memória:** a reinstalação da memória ocorreu 24 horas após a sessão de extinção e nos experimentos 4 e 9. Consistiu da exposição dos animais ao Contexto C (fig. 12), no qual foi disparado um choque nas patas de 0,3 mA/3 s. Nenhum comportamento foi mensurado.

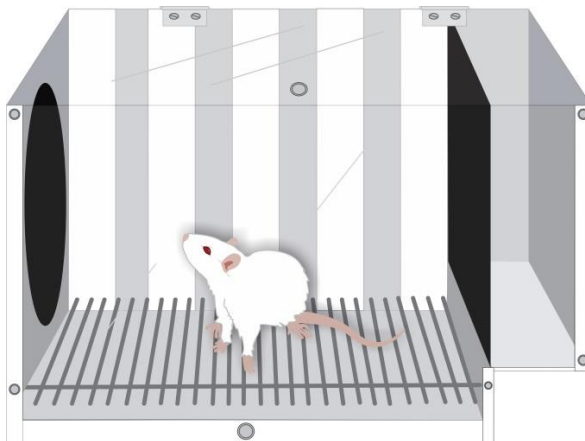


Figura 12: Contexto C.

- **Teste B:** o Teste B (fig. 13) correu 24 horas após o Teste A em todos os experimentos e consistiu da exposição dos animais ao Contexto B por 3 minutos. O comportamento de congelamento foi avaliado.



Figura 13: Contexto B

5. Resultados

5.1 Experimento 1: O canabidiol bloqueia a reconsolidação da memória de medo ao contexto

No intuito de investigar se o CBD bloqueia a reconsolidação de uma memória recente, 59 animais ($n = 7 - 12/\text{grupo}$) previamente condicionados receberam imediatamente após a sessão de evocação da memória veículo (VEI), CBD (3, 10 ou 30 mg/kg) ou MDZ (1,5 mg/kg; controle positivo). A ANOVA de uma via com medidas repetidas demonstrou uma interação entre os fatores tratamento e re-exposição ao Contexto A [$F(5,54) = 5,32$; $P = 0,0005$; fig. 14A]. Durante a sessão de evocação, todos os grupos se comportaram de maneira semelhante [$F(5,54) = 1,39$; $P = 0,24$; fig. 14A]. Entretanto, o teste de *post-hoc* de Newman-Keuls demonstrou que durante o Teste A, tanto os grupos tratados com CBD (3, 10 e 30 mg/kg) como com MDZ expressaram uma menor porcentagem de tempo de congelamento em relação ao grupo VEI. Em conjunto, esses dados sugerem que assim como o MDZ, o CBD pode reduzir os comportamentos de medo através do bloqueio da reconsolidação. Durante a exposição ao Teste B, a ANOVA de uma via demonstrou que não ocorreu nenhum efeito significativo do tratamento [$F(5,54) = 1,67$; $P = 0,16$]. Todos os grupos apresentaram níveis baixos e similares de congelamento, sugerindo a ausência de generalização no contexto neutro (fig. 14A).

Sabe-se que a indução da reconsolidação requer a evocação e labilização da memória. Dessa maneira, para reforçar os resultados anteriores, 19 animais previamente condicionados foram expostos ao contexto neutro B, para que não ocorresse a evocação e labilização da memória. Imediatamente após receberam VEI, CBD (10 mg/kg; dose mais efetiva) ou MDZ (1,5 mg/kg) e, no dia seguinte, foram expostos ao Contexto A. A ANOVA de uma via demonstrou que todos os grupos comportaram-se de maneira semelhante durante a exposição ao contexto neutro [$F(2,17) = 2,4$; $P = 0,12$; fig. 14B] e que não houve efeito do tratamento no dia do Teste A [$F(2,17) = 0,57$; $P = 0,58$; fig. 14B]. Tanto o grupo CBD, quanto o MDZ, apresentaram a mesma porcentagem de congelamento que o grupo controle (fig. 14B), sugerindo que o efeito dessas drogas depende da evocação da memória.

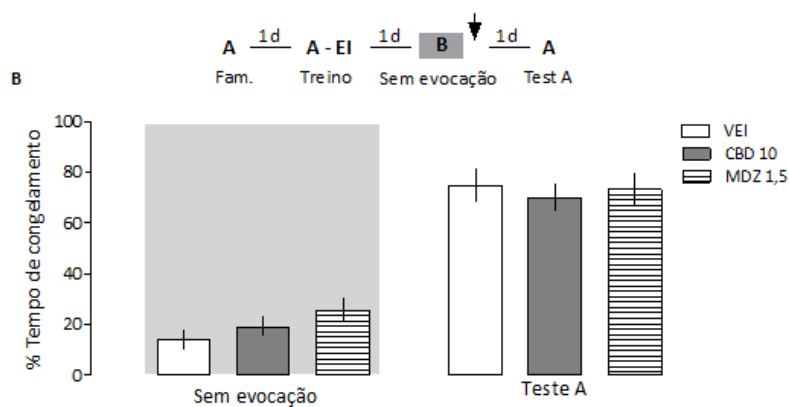
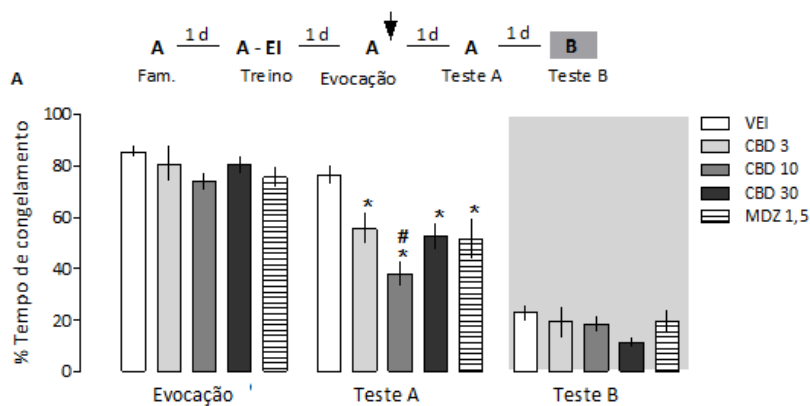


Figura 14: A: Evidência do efeito amnésico do CBD e do MDZ sobre a reconsolidação da memória de medo ao contexto. 24 horas após a familiarização, os animais foram condicionados ao Contexto A (treino; EC) após receberem 3 choques nas patas (EI). No dia seguinte, foram submetidos a uma sessão curta de evocação da memória no Contexto A. Imediatamente após, receberam por via i.p. veículo (VEI), CBD (3 – 30 mg/kg) ou MDZ (1,5 mg/kg). Após 24 horas, tanto os grupos tratados com CBD como os tratados com MDZ apresentaram uma redução na porcentagem de congelamento quando expostos ao Teste A. Nenhuma diferença foi observada quando os animais foram expostos ao Teste B. **B:** Quando a sessão de evocação foi omitida, nenhuma diferença foi observada nos grupos tratados com CBD (10 mg/kg) e MDZ (1,5 mg/kg) quando comparados ao VEI. A seta indica o momento de administração das drogas. Os dados são representados como Média \pm E.P.M. da porcentagem de congelamento. O asterisco indica uma diferença significativa ($P < 0,05$) em relação ao respectivo controle. A tralha indica uma diferença significativa em relação aos outros grupos tratados com CBD. ANOVA de uma via com medidas repetidas (comparações no Contexto A). ANOVA de uma via (Teste B).

5.2 Experimento 2: O tratamento com CBD seis horas após a evocação não prejudica a reconsolidação

A reconsolidação da memória é um processo gradual que dura aproximadamente 6 horas (SCHAFE E LEDOUX, 2000; DUDAI, 2004). Para avaliar se o prejuízo da memória causado pelo CBD é específico sobre fase de reconsolidação, 21 ratos previamente condicionados ($n = 7/\text{grupo}$) e receberam VEI, CBD (10 mg/kg) ou MDZ (1,5 mg/kg) 6 horas após a evocação da memória. A ANOVA de uma via com medidas repetidas mostrou que não houve uma interação do fator tratamento x repetição ao Contexto A [$F(2,18) = 0,72$; $P = 0,50$; fig. 15A] e nem um efeito principal desses fatores [$F(2,18) = 0,32$; $P = 0,73$] e [$F(1,18) = 1,61$; $P = 0,22$], respectivamente. A figura 15 demonstra que tanto o grupo CBD, quanto o MDZ apresentaram o mesmo perfil comportamental do grupo VEI, exibindo uma alta porcentagem de tempo de congelamento na evocação e no Teste A, sugerindo que o efeito amnésico dessas drogas não é observado quando administradas após o término da etapa de reconsolidação. Novamente, durante o Teste B todos os grupos apresentaram níveis baixos e similares de congelamento [$F(2,18) = 0,63$; $P = 0,54$].

5.3 Experimento 3: O efeito amnésico do CBD persiste ao longo do tempo

O uso do MDZ como controle positivo demonstra que o protocolo adotado favorece a indução da reconsolidação da memória e não a extinção, uma vez que benzodiazepínicos prejudicam a extinção de memórias aversivas (PEREIRA *et al.*, 1989). Embora uma re-exposição de 3 minutos ao EC tenda a favorecer a reconsolidação (BUSTOS *et al.*, 2009), seria possível que a redução do congelamento provocado pelo CBD tivesse ocorrido devido à facilitação da extinção, já que o CBD é capaz de facilitar esse processo (BITENCOURT, PAMPLONA & TAKAHASHI, 2008). Uma característica da extinção é o ressurgimento da resposta de defesa frente ao EC ao longo do tempo, fenômeno conhecido como recuperação espontânea (LATTAL & ABEL, 2004). Para excluir um efeito sobre a extinção, 25 ratos previamente condicionados receberam VEI ou CBD (10 mg/kg) ($n = 6 - 7/\text{grupo}$) imediatamente após a evocação da memória e foram re-expostos ao Contexto A no dia seguinte (Teste A_1) e 7 ou 21 dias após (Teste A_2). A ANOVA de uma via com medidas repetidas mostrou um efeito significativo do tratamento entre o Teste A_1 e o Teste A_2 nesses intervalos de tempo selecionados [7 dias: $F(1,11) = 25,9$; $P = 0,001$; Fig. 16A; 21 dias: $F(1,10) = 11,4$; $P = 0,01$; Fig. 16B]. O teste de *post-hoc* de Newman-Keuls demonstrou que enquanto o grupo CBD apresentou um menor tempo de congelamento no Teste A_2 e Teste A_1 quando comparado ao grupo controle, que manteve uma alta porcentagem de tempo de congelamento no Teste A_2 em relação ao Teste A_1 ($P = 0,93$ e $0,32$, respectivamente) ou em relação à sessão de evocação da memória ($P = 0,10$ e $0,23$, respectivamente). Em conjunto, esses resultados corroboram que no protocolo experimental adotado, uma sessão de evocação de 3 minutos favorece a reconsolidação, e sugere que o efeito amnésico do CBD dura por pelo menos 22 dias.

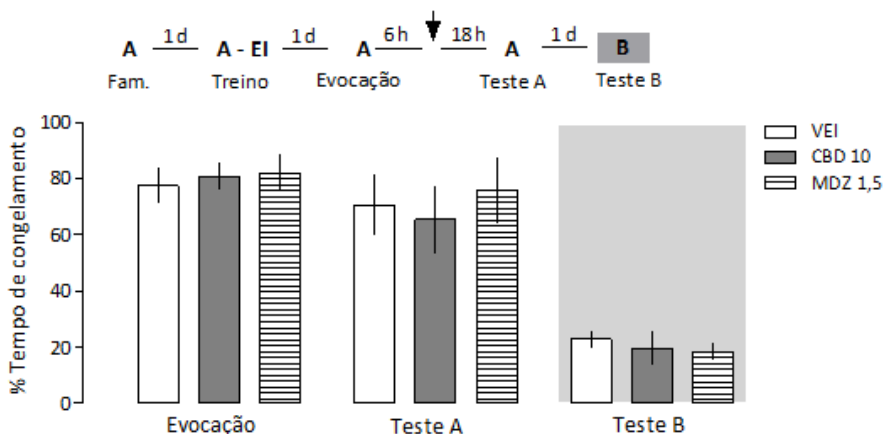


Figura 15: O efeito do CBD e do MDZ sobre a reconsolidação da memória é restrito à janela temporal da reconsolidação. Um dia após a sessão de treino (descrito na fig. 14) os animais foram expostos ao Contexto A para induzir a evocação da memória. Seis horas após, os animais receberam VEI, CBD (10 mg/kg) ou MDZ (1,5 mg/kg). Quando expostos ao Teste A após 24 horas, nenhum efeito do tratamento foi observado. A seta indica o momento da administração das drogas. Os dados são representados como Média \pm E.P.M. da porcentagem de congelamento. ANOVA de uma via com medidas repetidas (comparações no Contexto A). ANOVA de uma via (Teste B).

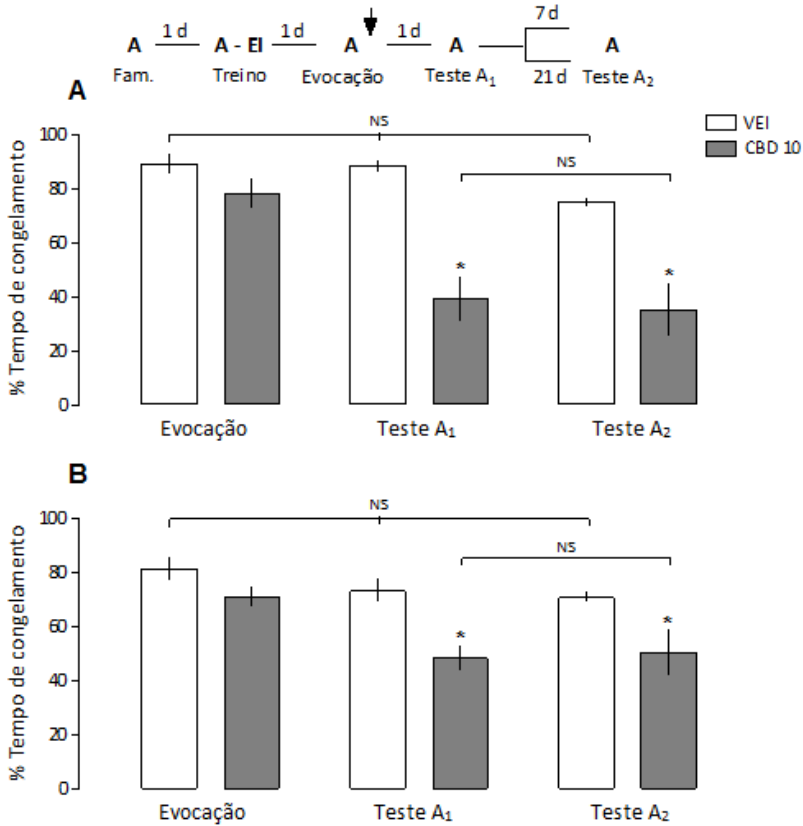


Figura 16: Não existe recuperação espontânea até 22 dias após o tratamento com CBD. Um dia após a sessão de treino (descrito na fig. 14) os animais foram expostos ao Contexto A para induzir a evocação da memória. Imediatamente após, os animais receberam VEI ou CBD (10 mg/kg). A avaliação da recuperação espontânea ocorreu no Teste A₂ 7 (A) ou 21 (B) dias após o Teste A₁. Enquanto os grupos que receberam CBD mantiveram uma baixa porcentagem de tempo de congelamento ao longo do tempo, os grupos controle apresentaram uma porcentagem de congelamento similares as da sessão de evocação da memória. A seta indica o momento da administração das drogas. Os dados são representados como Média \pm E.P.M. da porcentagem de congelamento. ANOVA de uma via com medidas repetidas. O asterisco indica uma diferença significativa ($P < 0,05$) em relação ao respectivo controle. NS indica não significativo

5.4 Experimento 4: A memória prejudicada pelo CBD não sofre reinstalação

Apesar de o experimento anterior sugerir que o efeito amnésico do CBD ocorra por um prejuízo de reconsolidação, o fenômeno de recuperação espontânea não exclui completamente uma facilitação da extinção já que, por ser espontâneo, poderia acontecer somente em períodos mais tardios aos avaliados. Outra característica da extinção é a reinstalação da memória, a qual ocorre após o indivíduo entrar em contato com o EI em um contexto diferente do original, o que permite a reinstalação da memória de medo extinta e retorno do comportamento condicionado frente ao EC. Então, para confirmar os resultados anteriores de que o CBD prejudica a reconsolidação, 19 ratos previamente condicionados receberam VEI ou CBD (10 mg/kg; $n = 9 - 10/\text{grupo}$) imediatamente após a sessão de evocação da memória. Um dia após o Teste A, ambos os grupos foram submetidos a uma sessão de extinção de 10 minutos no Contexto A, após 24 horas receberam um choque leve nas patas (0,3 mA/3 s) no Contexto C e no dia seguinte foram re-expostos ao Contexto A (Teste A₂). No Teste A₂ a reinstalação da memória foi avaliada por 5 minutos.

A ANOVA de uma via com medidas repetidas mostrou uma interação entre os fatores tratamento e re-exposição ao Contexto A [$F(3,51) = 3,6$; $P = 0,05$, fig. 17]. O teste de *post-hoc* de Newman-Keuls demonstrou que durante a evocação da memória todos os grupos apresentaram uma porcentagem de tempo de congelamento similar, entretanto durante o Teste A₁ o grupo CBD apresentou menor tempo de congelamento do que o grupo controle. Essa diferença foi abolida após a sessão de extinção, quando ambos os grupos apresentaram uma redução na porcentagem de tempo de congelamento ($P = 0,28$). Entretanto, durante o Teste A₂ o grupo VEI apresentou uma elevação na resposta de congelamento em relação à sessão de extinção, enquanto que o grupo CBD manteve o nível de congelamento baixo, caracterizando uma ausência de reinstalação da memória. A ANOVA de uma via demonstrou que não houve efeito do tratamento durante a exposição ao Teste B, realizado após 24 horas [$F(1,17) = 0,01$; $P = 0,97$, fig. 17].

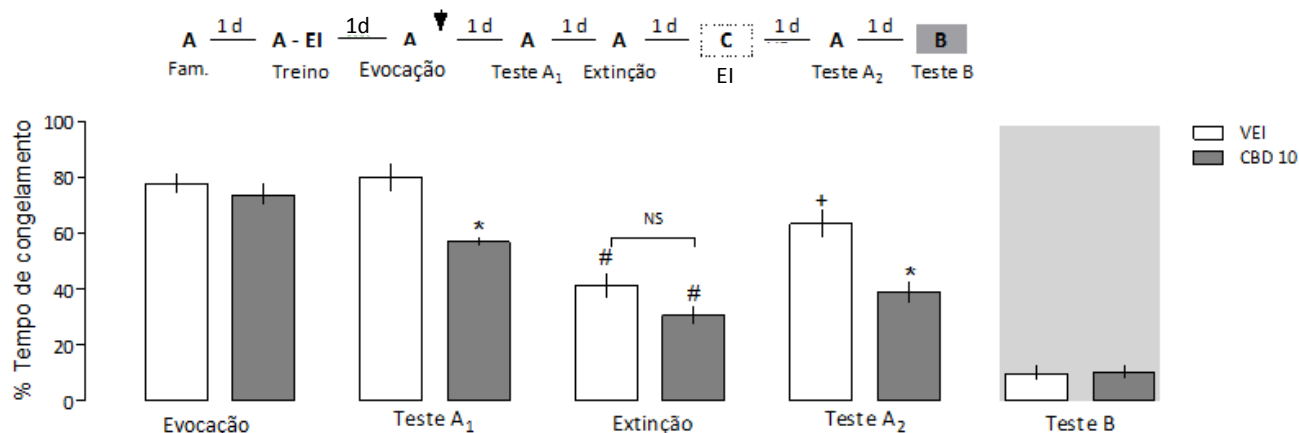


Figura 17: A memória cuja reconsolidação foi prejudicada pela administração de CBD não apresenta reinstalação. No dia após a sessão de treino (figura 14), os animais foram re-expostos ao Contexto A por 3 minutos, para induzir a evocação, e imediatamente após receberam VEI ou CBD (10 mg/kg). Em comparação com o grupo controle, os animais que receberam CBD apresentaram uma menor porcentagem de tempo de congelamento quando expostos ao Teste A, após 24 horas. No dia seguinte, ambos os grupos foram submetidos a uma sessão de extinção no Contexto A por 10 minutos. Ambos os grupos apresentaram uma porcentagem de congelamento baixa e similar ao término dos 10 minutos. Após 24 horas, os animais foram expostos ao Contexto C por 1 minuto, onde receberam um choque leve nas patas (EI). No dia seguinte, os animais foram re-expostos ao Contexto A por 5 minutos para avaliação da reinstalação da memória. Durante essa sessão, o grupo controle apresentou um aumento na porcentagem de tempo de congelamento em relação a sessão de extinção da memória, já o grupo CBD manteve uma baixa porcentagem de congelamento. A seta indica o momento da administração das drogas. Os dados são representados como Média ± E.P.M. da porcentagem de congelamento. O asterisco indica uma diferença significativa em relação ao respectivo controle ($P < 0,05$), a tralha indica uma diferença em relação ao mesmo grupo durante o Teste A, o símbolo de mais indica uma diferença significativa em relação ao mesmo grupo da sessão de extinção. ‘NS’ denota uma ausência de diferença significativa. ANOVA de uma via com medidas repetidas (comparações no Contexto A). ANOVA de uma via (Teste B).

5.5 Experimento 5: O CBD prejudica a reconsolidação de uma memória de 7 dias

Para investigar se o CBD também poderia afetar memórias mais velhas, 17 ratos previamente condicionados foram randomicamente alocados em dois grupos ($n = 8 - 9/\text{grupo}$) e tratados com VEI ou CBD (10 mg/kg) imediatamente após a evocação da memória adquirida 7 dias antes. A ANOVA com medidas repetidas demonstrou uma interação entre os fatores tratamento e repetição [$F(2,28) = 10,5$; $p < 0,001$]. O teste de *post-hoc* de Newman-Keuls demonstrou que, durante a sessão de evocação da memória os dois grupos apresentaram uma mesma porcentagem de tempo de congelamento ($P = 0,40$; fig. 18), entretanto, durante o Teste A o grupo que recebeu CBD apresentou uma menor porcentagem de congelamento, sugerindo que memórias mais velhas também são susceptíveis aos efeitos do CBD. Com relação à exposição ao Teste B, a ANOVA de uma via não demonstrou nenhuma interação significativa entre o tratamento e a re-exposição ao Contexto B [$F(1,15) = 0,22$; $P = 0,66$] e nem um efeito principal desses fatores [$F(1,15) = 4,3$; $P = 0,06$ e $F(1,15) = 0,14$; $P = 0,71$, respectivamente]. Ambos os grupos expressaram níveis semelhantes de congelamento quando expostos aos dois Testes B ($B_1: P = 0,36$) ($B_2: P = 0,32$).

5.6 Experimento 6: O efeito do amnésico do CBD depende da ativação dos receptores CB1

Apesar de o CBD ser um fitocanabinoide, seu mecanismo de ação não se restringe ao sistema endocanabinoide. Portanto, para investigar como o CBD prejudica a reconsolidação de uma memória de medo contextual, 53 ratos previamente condicionados foram alocados em 6 grupos ($n = 8 - 9/\text{grupo}$) e imediatamente após a sessão de evocação foram tratados sistemicamente com veículo, WAY100635 (0,1mg/kg) ou AM251 (1,0 mg/kg). Após 30 minutos, foram subdivididos em grupos que receberam veículo ou CBD (10 mg/kg).

A ANOVA de uma via demonstrou que durante a evocação todos os grupos se comportaram de maneira semelhante [$F(2,46) = 1,38$; $P = 0,26$]. A ANOVA de duas vias com medidas repetidas demonstrou uma interação entre os fatores pré-tratamento e tratamento [$F(2,46) = 3,3$; $P = 0,05$]. Como mostrado na figura 19, o teste de *post-hoc* de Newman-Keuls demonstrou que durante o Teste A, o grupo VEI – CBD apresentou uma menor porcentagem de congelamento do que o grupo VEI – VEI, demonstrando que, mesmo após 30 minutos da evocação da

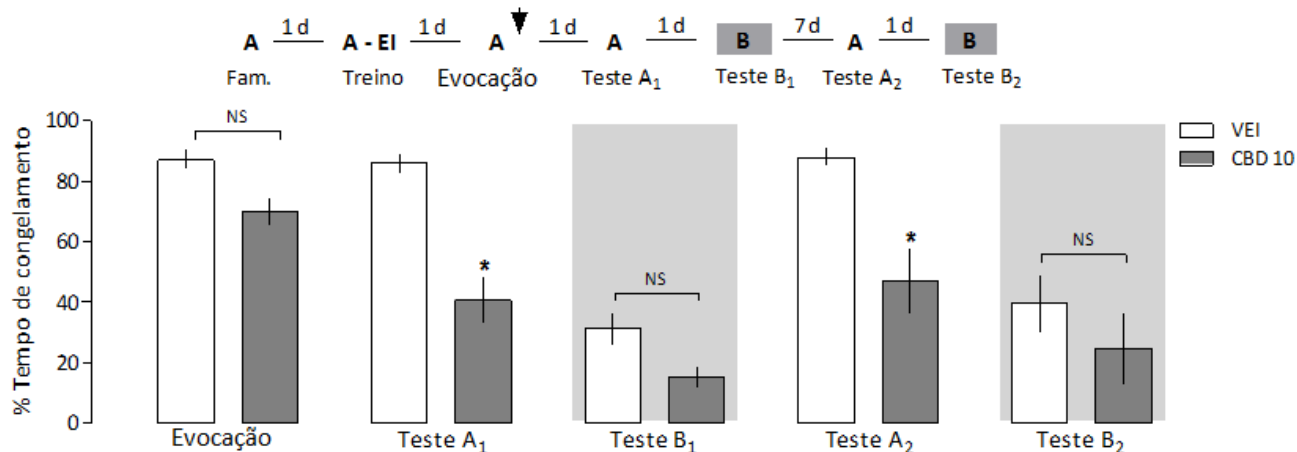


Figura 18: O CBD bloqueia a reconsolidação de uma memória de 7 dias. Sete dias após a sessão de treino (figura 14), os animais foram re-expostos ao Contexto A por 3 minutos, para induzir a evocação, e imediatamente após receberam VEI ou CBD (10 mg/kg). Em comparação com o grupo controle, os animais tratados com CBD apresentaram uma menor porcentagem de tempo de congelamento quando expostos ao Teste A₁, após 24 horas e após 7 dias (Teste A₂). Nenhuma diferença foi observada quando os animais foram expostos aos dois Testes B. A seta indica o momento de administração das drogas. Os dados são representados como Média \pm E.P.M. da porcentagem de congelamento. O asterisco indica uma diferença significativa ($P < 0,05$) em relação ao respectivo controle. 'NS' significa não significativo. A tralha indica uma diferença significativa em relação aos outros grupos tratados com CBD. ANOVA de uma via com medidas repetidas (comparações no Contexto A). ANOVA de uma via (Teste B).

memória, o CBD ainda exerce um bloqueio da reconsolidação. Além disso, pode-se observar que o tratamento com os dois antagonistas não produziu nenhuma alteração comportamental em relação ao grupo controle. No entanto, o pré-tratamento com AM251 aboliu o efeito do CBD, enquanto que o pré-tratamento com WAY100635 não. Dessa maneira, pode-se sugerir que, pelo menos nessas doses, o prejuízo da reconsolidação promovido pelo CBD depende da ativação dos receptores CB1 e não 5-HT_{1A}.

5.7 Experimento 7: A administração sistêmica de CBD reduz a expressão de Zif268 no córtex pré-frontal medial

Após a evocação da memória tem-se demonstrado um aumento na expressão da proteína Zif268 em áreas como o hipocampo dorsal e amígdala, enquanto que no CPFm os resultados são contraditórios. Como é sugerido que os efeitos emocionais e cognitivos do CBD são mediados pelo CPFm, 12 animais previamente condicionados, foram divididos em 3 grupos: sem – evocação e com evocação, veículo ou CBD (10 mg/kg), administrados imediatamente após a evocação da memória. Após 1 hora, os animais foram submetidos a perfusão intracardíaca para posterior análise imunohistoquímica do CPFm, ou seja, do CC, PL e IL.

A ANOVA de três vias revelou uma interação entre os fatores evocação ou não evocação da memória x sub-regiões do CPFm x tratamento [$F(4,29) = 6.23$; $P = 0,001$]. A análise de *post-hoc* de Newman-Keuls demonstrou que houve um aumento significativo na expressão de Zif268 no córtex PL e no CC entre os grupos com evocação, enquanto que a expressão no IL permaneceu baixa (fig. 20). No grupo sem evocação, após uma hora, não ocorreu um aumento significativo na expressão dessa proteína em nenhuma das regiões analisadas (fig. 20). O teste de *post-hoc* de Newman-Keuls também demonstrou uma diferença significativa entre os grupos tratados com CBD no CC e no PL, nos quais ocorreu uma redução da expressão de Zif268 em relação grupo controle (fig. 20). Como anteriormente demonstrado, não houve diferença na expressão de Zif268 no IL (fig. 20).

Em conjunto esses resultados demonstram um recrutamento do córtex PL e do CC após a evocação da memória, sugerindo uma possível participação dessas áreas na etapa de reconsolidação da memória. Além disso, esses dados confirmam os resultados que demonstram que o PL é

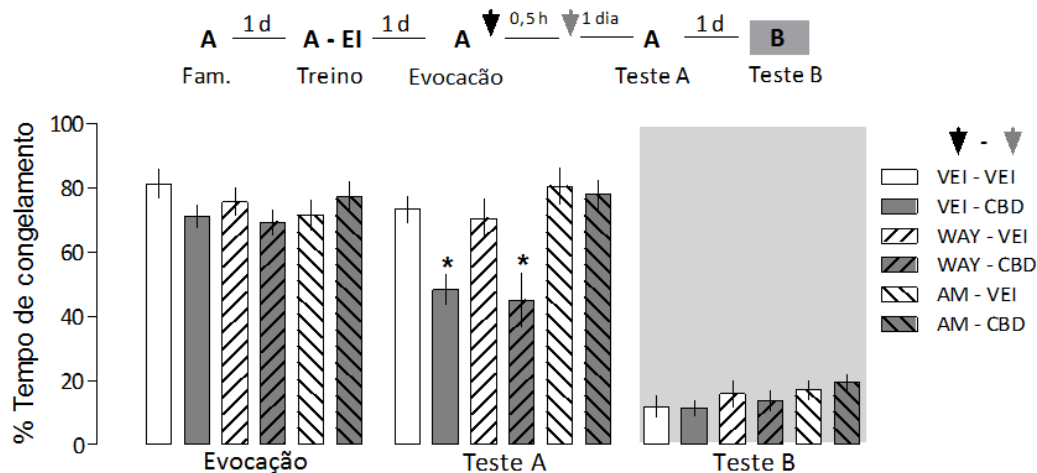


Figura 19: O prejuízo da memória causado pelo CBD é mediado pelos receptores canabinoides do tipo 1 (CB1) e não pelos receptores de serotonina do tipo 5-HT_{1A}. Um dia após a sessão de treino (descrito na fig. 14) os animais foram expostos ao Contexto A para induzir a evocação da memória. Imediatamente após, os animais foram pré-tratados com VEI, WAY100635 (antagonista 5-HT_{1A}; 0,1 mg/kg) ou AM251 (antagonista CB1; 1,0 mg/kg) e após 30 minutos foram tratados com VEI ou CBD (10 mg/kg). Quando expostos ao Teste A após 24 horas, os grupos VEI-CBD e WAY-CBD apresentaram uma menor porcentagem no tempo de congelamento em relação aos respectivos grupos controle (VEI-VEI; WAY-VEI), enquanto que o grupo AM251 – CBD não apresentou nenhuma diferença do grupo AM251 – VEI. Quando expostos ao Teste B nenhuma diferença foi observada. A seta indica o momento da administração das drogas. O asterisco indica uma diferença significativa ($P < 0,05$) em relação ao grupo controle. Os dados são representados como Média \pm E.P.M. da porcentagem de congelamento. ANOVA de uma via com medidas repetidas (comparações no Contexto A). ANOVA de uma via (Teste B).

um dos substratos neurais dos efeitos do CBD, e reforçam a teoria que o CPFm pode ser o substrato neural para os efeitos cognitivos do CBD.

5.8 Experimento 8: A inativação temporária do córtex PL prejudica a reconsolidação da memória de medo ao contexto

Para investigar se a atividade do córtex PL contribui para a reconsolidação da memória, 15 ratos previamente condicionados foram alocados em dois grupos, veículo ou muscimol (4,0 nmol/0,2 μ L; $n = 7 - 8$ /grupo), infundidos bilateralmente no PL imediatamente após a evocação da memória.

A ANOVA de uma via com medidas repetidas demonstrou uma interação entre os fatores tratamento e repetição [$F(1,13) = 21,1$; $P = 0,0005$]. O teste de *post-hoc* de Newman-Keuls demonstrou que ambos os grupos apresentaram níveis semelhantes de congelamento durante a sessão de evocação, enquanto que na exposição ao Teste A, o grupo cujo PL foi temporariamente inativado apresentou uma redução na porcentagem de tempo de congelamento em relação ao grupo controle (fig. 21A), reforçando os dados anteriores que am um aumento do Zif268 após a evocação da memória e sugerindo um papel do PL na reconsolidação. Além disso, a ANOVA de uma via não demonstrou nenhuma diferença entre os grupos quando expostos ao Contexto B [$F(1,13) = 0,05$; $P = 0,82$].

Para confirmar que o efeito da inativação do PL depende da evocação e labilização da memória, 14 ratos previamente condicionados ($n = 6 - 8$ /grupo) receberam a infusão bilateral de veículo ou muscimol no PL após a exposição ao Contexto B (para não induzir a labilização da memória). A ANOVA de uma via mostrou que não houve um efeito do tratamento nessa sessão ou na re-exposição ao Contexto A após 24 horas [$F(1,12) = 0,005$; $P = 0,94$]. Em ambos os casos, os dois grupos apresentaram porcentagens de congelamento semelhantes (fig. 21B) sugerindo que o bloqueio da reconsolidação induzido pela inativação do PL depende da evocação da memória. Além disso, sugere que a inativação do PL é de fato temporária, uma vez que a atividade do mesmo é crucial para a expressão do medo (BURGOS – ROBLES, VIDAL – GONZALEZ, QUIRK, 2009).

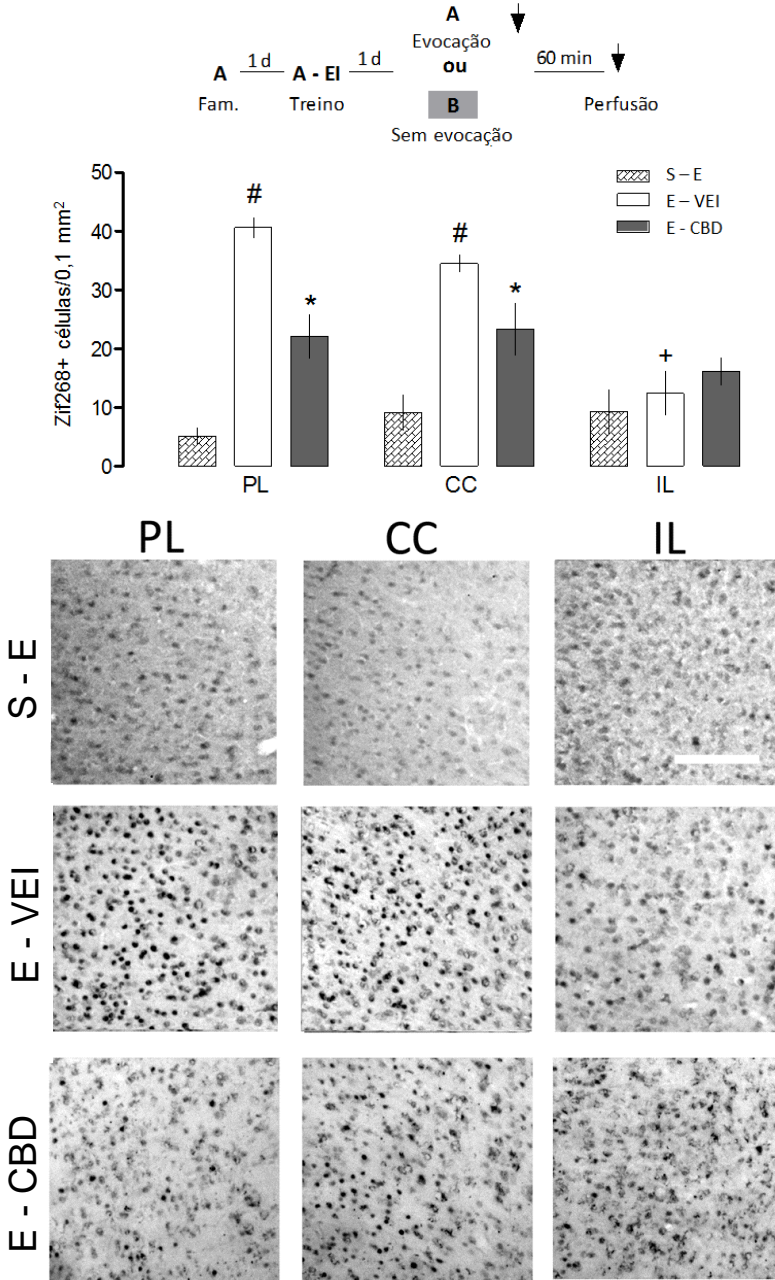


Figura 20: O CBD reduz a expressão de Zif268 induzida pela evocação da memória no córtex pré-límbico e cingulado, mas não no infralímbico. Um dia após a sessão de treino (descrito na fig. 14) os animais foram expostos ao Contexto A para induzir a labilização da memória. Imediatamente após, os animais foram tratados com VEI ou CBD (10 mg/kg). Uma hora após o tratamento farmacológico os animais foram sacrificados para posterior análise imunohistoquímica para a expressão de Zif268 no córtex pré-frontal medial. Um grupo independente não teve a memória labilizada. Na ausência de evocação da memória (S - E) não houve um aumento expressivo dessa proteína nas três sub-regiões do córtex analisadas. Uma hora após a evocação houve um aumento significativo de Zif268 no grupo que recebeu VEI (E - VEI). O tratamento com CBD após a evocação (E - CBD) preveniu significativamente o aumento da expressão de Zif268 nessas duas áreas. A primeira seta indica o momento da administração das drogas e a segunda representa o momento da perfusão intracardíaca. O asterisco indica uma diferença significativa ($P < 0,05$) em relação ao respectivo grupo controle (E - VEI). A tralha indica um aumento significativo em relação ao respectivo grupo sem evocação. O símbolo de mais indica uma diferença em relação ao grupo E - VEI do PL e CC. Os dados são representados como Média \pm E.P.M. da quantidade de células imunorreativas para o Zif268. ANOVA de duas vias.

Para confirmar que o efeito da inativação do PL depende da evocação e labilização da memória, 14 ratos previamente condicionados ($n = 6 - 8/\text{grupo}$) receberam a infusão bilateral de veículo ou muscimol no PL após a exposição ao Contexto B (para não induzir a labilização da memória). A ANOVA de uma via mostrou que não houve um efeito do tratamento nessa sessão ou na re-exposição ao Contexto A após 24 horas [$F(1,12) = 0,005$; $P = 0,94$]. Em ambos os casos, os dois grupos apresentaram porcentagens de congelamento semelhantes (fig. 21B) sugerindo que o bloqueio da reconsolidação induzido pela inativação do PL depende da evocação da memória. Além disso, sugere que a inativação do PL é de fato temporária, uma vez que a atividade do mesmo é crucial para a expressão do medo (BURGOS - ROBLES, VIDAL - GONZALEZ, QUIRK, 2009).

Para confirmar que o efeito do muscimol foi seletivo ao PL e que a parte mais ventral do CPFm, o IL, não foi atingido, um grupo independente foi condicionado e após a evocação da memória foi dividido em veículo e muscimol ($n = 7 - 8/\text{grupo}$), no entanto, a administração bilateral ocorreu no IL e não no PL. A ANOVA de uma via com medidas repetidas demonstrou que não houve nenhuma

interação entre os fatores tratamento e re-exposição ao Contexto A [$F(1,13) = 3,5$; $P = 0,08$] e nem um efeito principal desses fatores [$F(1,13) = 0,09$; $P = 0,76$ e $F(1,13) = 0,87$; $P = 0,36$, respectivamente].

Como demonstrado na figura 21C, os grupos apresentaram uma porcentagem de tempo de congelamento semelhante durante a evocação da memória e o Teste A. Dessa maneira, os resultados sugerem que a atividade do IL, na dose de muscimol testada, não interfere com o processo de reconsolidação de uma memória de medo ao contexto e que a atividade do PL parece ser importante para a reconsolidação da memória. Além disso, a ANOVA de uma via não demonstrou nenhum efeito significativo do tratamento quando os animais foram expostos ao Teste B após 24 horas [$F(1,13) = 0,31$; $P = 0,58$].

5.9 Experimento 9: O resultado da inativação do PL é duradouro e não está sujeito a reinstalação da memória

Uma vez que o CPFm governa as funções relacionadas a extinção das memórias, para confirmar que o efeito observado com a inativação do PL era sobre a reconsolidação e não uma facilitação da extinção, 16 animais previamente condicionados receberam veículo ou muscimol ($n = 6 - 10/\text{grupo}$) no PL bilateralmente logo após a evocação da memória, e foram re-expostos ao Contexto A após 1 e 10 dias, para avaliarmos se o efeito da inativação do PL sobre o comportamento era duradouro.

A ANOVA de uma via com medidas repetidas demonstrou um efeito significativo do tratamento nesses dois tempos avaliados. O teste de *post-hoc* de Newman-Keuls demonstrou que tanto no Teste A₁ como no Teste A₂ os animais que tiveram o PL inativado apresentaram uma redução significativa na porcentagem de tempo de congelamento, enquanto que o grupo controle manteve a expressão do congelamento alta ao longo do tempo (fig. 22).

Exposições longas e repetidas ao contexto pareado sem a apresentação do EI podem levar a extinção do medo. Como a reinstalação da memória é uma característica da extinção (MYERS & DAVIS, 2002), os animais foram submetidos a uma sessão de extinção de 15 minutos no Contexto A um dia após o Teste A₂ para excluir essa possibilidade. No dia seguinte, ambos os grupos receberam um choque leve nas patas no Contexto C e foram re-expostos ao Contexto A por 5 minutos após 24 horas no intuito de verificarmos se ocorreu a reinstalação da memória. A ANOVA de uma via com medidas repetidas demonstrou uma interação significativa entre os fatores tratamento e re-exposição ao Contexto A [$F(4,48) = 4,3$; $P = 0,004$]. O teste de *post-hoc*

de *Newman-Keuls* demonstrou que em relação ao Teste A₂ os grupos apresentaram a extinção da memória e que durante o teste da reinstalação o grupo controle apresentou um aumento na porcentagem de tempo de congelamento em relação à sessão de extinção, enquanto que o grupo cujo PL foi inativado manteve uma baixa expressão de congelamento (fig. 22). Quando expostos ao Teste B após 24 horas, a ANOVA de uma via não demonstrou efeito do tratamento [$F(1,10) = 1,1$; $P = 0,31$]. Em conjunto, esses dados confirmam a participação do PL na etapa de reconsolidação da memória.

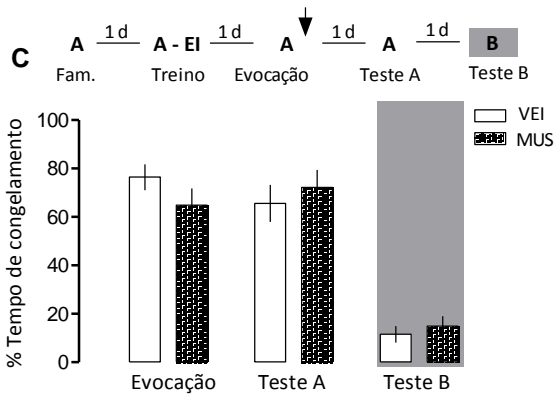
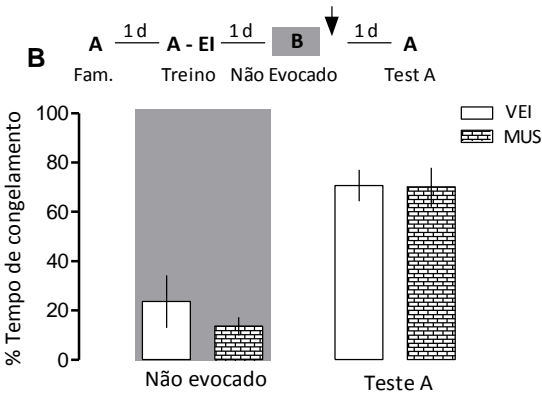
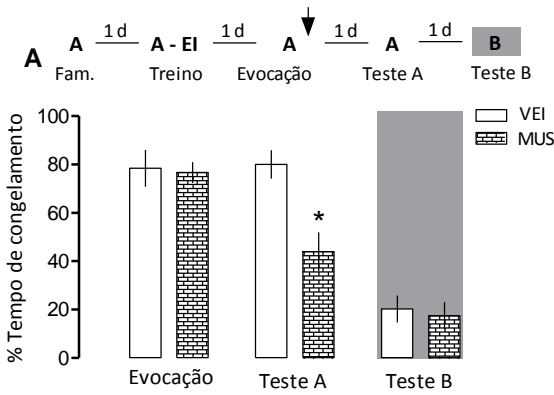


Figura 21: A: A inativação do córtex PL prejudica a reconsolidação da memória de medo. Um dia após a sessão de treino (figura 14), os animais foram re-expostos ao Contexto A por 3 minutos, para induzir a evocação, e imediatamente após receberam a infusão bilateral de VEI ou muscimol (MUS; 4,0 nmol/0,2 µL) no PL. Em comparação com o grupo controle, os animais cujo PL foi inativado apresentaram uma menor porcentagem de tempo de congelamento quando expostos ao Teste A, após 24 horas. Nenhuma diferença foi observada quando os animais foram expostos ao Teste B. **B:** A evocação da memória é necessária para o efeito da inativação do PL. No dia seguinte a sessão de treino, os animais foram expostos por 3 minutos ao Contexto B, não pareado, para evitar a labilização da memória. Imediatamente após, receberam a infusão bilateral de VEI ou MUS (4,0 nmol/0,2 µL) no PL. Quando expostos ao Teste A após 24 horas, nenhuma diferença foi observada. **C:** A inativação do córtex IL não altera a expressão do congelamento. Um dia após a sessão de treino (figura x), os animais foram re-expostos ao Contexto A por 3 minutos, para induzir a labilização, e imediatamente após receberam a infusão bilateral de VEI ou MUS (4,0 nmol/0,2 µL) no IL. Não houve diferença entre os grupos na porcentagem de tempo de congelamento quando expostos ao Teste A, após 24 horas. Nenhuma diferença foi observada quando os animais foram expostos ao Teste B. A seta indica o momento da inativação. Os dados são representados como Média ± E.P.M. da porcentagem de congelamento. O asterisco indica uma diferença significativa ($P < 0,05$) em relação ao respectivo controle. A tralha indica uma diferença significativa em relação aos outros grupos tratados com CBD. ANOVA de uma via com medidas repetidas (comparações no Contexto A). ANOVA de uma via (Teste B).

5.10 Experimento 10: A atividade do PL é importante para a reconsolidação de memórias recentes e remotas

Para investigar se a atividade do córtex PL é importante para a reconsolidação de memórias mais velhas, 33 animais previamente condicionados foram alocados em 4 grupos ($n = 8 - 9/\text{grupo}$) e imediatamente após a evocação da memória, adquirida 7 ou 21 dias antes, receberam a infusão bilateral de VEI ou MUS (4,0 nmol/0,2 µL) no PL. A ANOVA com medidas repetidas demonstrou que nos dois casos houve uma interação entre os fatores tratamento e repetição [$F(1,14) = 34,7$; $P = 0,00004$ e $F(1,15) = 27,9$; $P = 0,00009$, respectivamente]. Como mostrado na figura 23, todos os grupos expressaram uma porcentagem de congelamento semelhante durante a evocação da memória, no entanto, durante o Teste A os animais cujo PL

foi inativado apresentaram uma menor porcentagem de congelamento em relação ao respectivo grupo controle. Durante o Teste B, a ANOVA de uma via não demonstrou nenhuma efeito do tratamento [7 dias: $F(1,14) = 0,02$; $P = 0,91$; 21 dias: $F(1,15) = 0,03$; $P = 0,86$]. Para confirmar esse efeito, quando a evocação da memória de 7 e 21 dias foi omitida ($n = 6 - 8/\text{grupo}$), a ANOVA de uma via demonstrou uma ausência de efeito da inativação do córtex PL [7 dias: $F(1,14) = 0,23$; $P = 0,64$; 21 dias: $F(1,12) = 0,13$; $P = 0,76$] quando os animais foram expostos ao Teste A. Esses resultados sugerem que a atividade do PL também participa da reconsolidação de memória remotas.

Tabela 1: A inativação temporária do córtex PL não modifica a porcentagem de tempo de congelamento quando a evocação da memória é omitida. Os dados são representados como Média \pm E.P.M. da porcentagem de congelamento. ANOVA de uma via (Sem evocação e Teste B).

	7 dias		21 dias	
	veículo	muscimol	veículo	muscimol
Sem evocação	13,9 \pm 4,3	20,9 \pm 6,2	18,3 \pm 3,3	18,7 \pm 2,5
Teste A	60,3 \pm 7,0	52,7 \pm 7,9	67,0 \pm 8	67,5 \pm 5,4

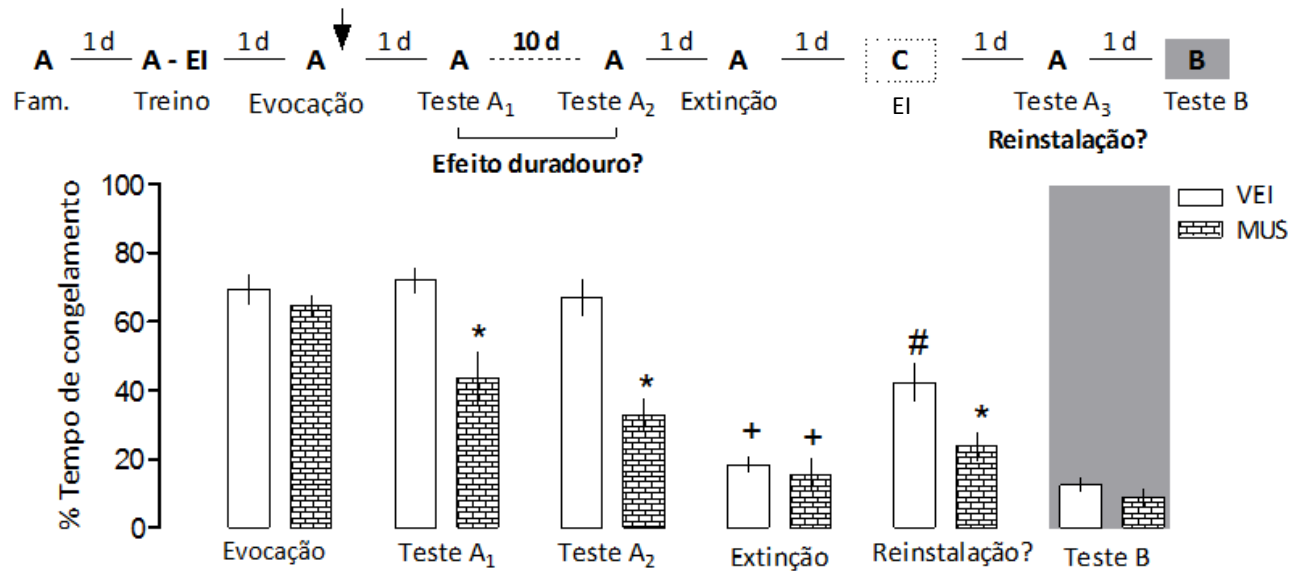


Figura 22: A memória cuja reconsolidação foi prejudicada pela inativação do PL é duradoura e não apresenta reinstalação. No dia após a sessão de treino (figura 14), os animais foram re-expostos ao Contexto A por 3 minutos, para induzir a labilização, e imediatamente após receberam a infusão bilateral de VEI ou MUS (4,0 nmol/0,2 µL). Em comparação com o grupo controle, os animais com o PL inativado apresentaram uma menor porcentagem de tempo de congelamento quando expostos ao Teste A, após 24 horas. Esse efeito foi observado por até 11 dias. No dia seguinte, ambos os grupos foram submetidos a uma sessão de extinção no Contexto A por 15 minutos. Ambos os grupos apresentaram uma porcentagem de congelamento baixa e similar ao término da sessão. Após 24 horas, os animais foram expostos ao Contexto C por 1 minuto, onde receberam um choque leve nas patas. No dia seguinte, os animais foram re-expostos ao Contexto A por 5 minutos para avaliação da reinstalação da memória. Durante essa sessão, o grupo controle apresentou um aumento na porcentagem de tempo de congelamento em relação a sessão de extinção da memória, já o grupo MUS manteve uma baixa porcentagem de congelamento. A seta indica o momento da administração das drogas. Os dados são representados como Média \pm E.P.M. da porcentagem de congelamento. O asterisco indica uma diferença significativa em relação ao respectivo controle ($*P < 0,05$), a tralha (#) indica uma diferença em relação ao mesmo grupo após a extinção da memória, o símbolo de mais (+) indica uma diferença significativa em relação ao Teste A₂. ANOVA de uma via com medidas repetidas (comparações no Contexto A). ANOVA de uma via (Teste B).

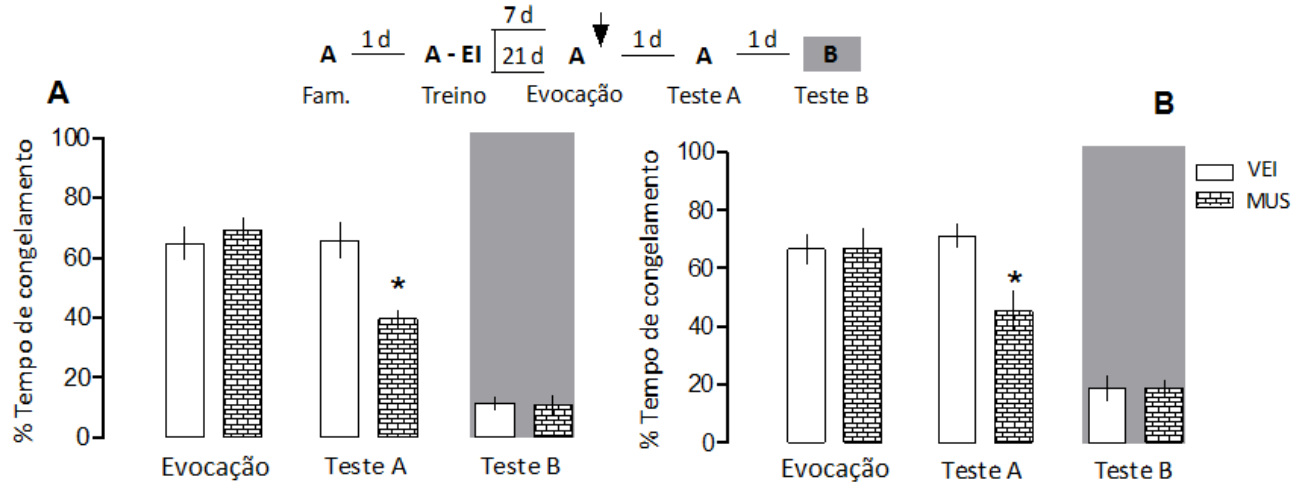


Figura 23: A atividade do córtex PL é importante para a reconsolidação de memórias recentes e remotas. 7 ou 21 dias após a sessão de treino (descrito na fig. 14) os animais foram expostos ao Contexto A para induzir a labilização da memória. Imediatamente após, os animais receberam a infusão bilateral de VEI ou MUS (4,0 nmol/0,2 μ L). Quando expostos ao Teste A após 24 horas, os grupos que receberam MUS no PL apresentaram uma menor porcentagem no tempo de congelamento em relação aos respectivos grupos controle. Quando expostos ao Teste B nenhuma diferença foi observada. As setas indicam o momento da administração das drogas. O asterisco indica uma diferença significativa ($P < 0,05$) em relação ao grupo controle. Os dados são representados como Média \pm E.P.M. da porcentagem de congelamento. ANOVA de uma via com medidas repetidas (comparações no Contexto A). ANOVA de uma via (Teste B).

5.11 Experimento 11: O bloqueio dos receptores CB1 no córtex PL impede o efeito da administração sistêmica de CBD sobre a reconsolidação

Com base no efeito do CBD sobre a expressão de Zif268 no PL e no papel do PL na reconsolidação, esse experimento foi realizado para verificarmos se o bloqueio dos receptores CB1 do córtex PL impediria o efeito sobre a reconsolidação da administração sistêmica de CBD. Dessa maneira,²³ animais previamente condicionados foram alocados em 4 grupos ($n = 5 - 6/\text{grupo}$) e imediatamente após a evocação da memória, receberam a infusão bilateral de VEI ou AM251 (50 pmol/0,2 μL) no PL e a administração sistêmica de VEI ou CBD (10 mg/kg). A ANOVA de duas vias com medidas repetidas demonstrou uma interação significativa entre os fatores pré-tratamento, tratamento e repetição [$F(1,20) = 8,25$; $P = 0,009$]. O teste de *post-hoc* de Newman-Keuls demonstrou que todos os grupos apresentaram uma porcentagem de congelamento semelhante durante a evocação, como mostrado na figura 24. No entanto, durante o Teste A o grupo VEI – CBD apresentou uma redução na porcentagem de tempo de congelamento, um efeito que foi bloqueado pelo antagonismo dos receptores CB1 do córtex PL. Esse resultado sugere que o efeito da administração sistêmica de CBD sobre a reconsolidação envolve a ativação dos receptores CB1 presentes no córtex PL de ratos. Além disso, a ANOVA de duas vias demonstrou que durante o Teste B não houve nenhuma interação significativa entre o pré-tratamento e o tratamento [$F(1,20) = 3,30$; $P = 0,09$].

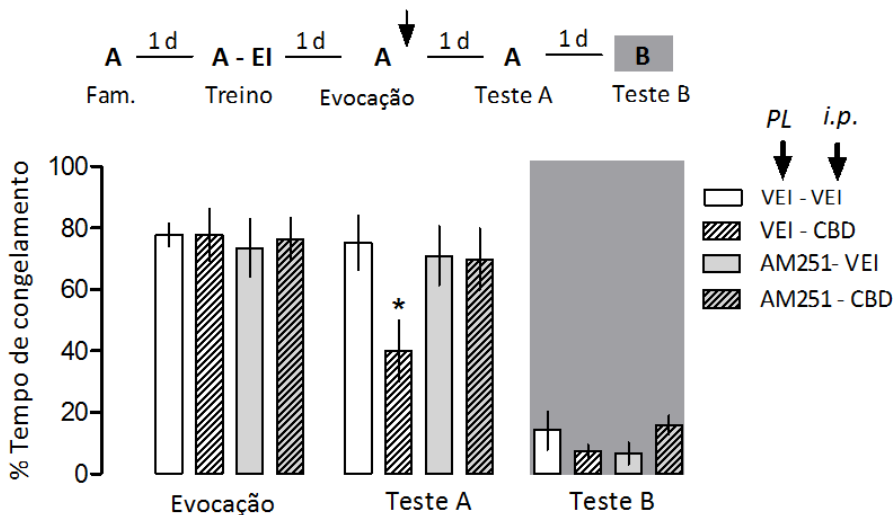


Figura 24: O prejuízo da memória causado pelo CBD é mediado pelos receptores canabinoides do tipo 1 (CB1) presentes no córtex PL. Um dia após a sessão de treino (descrito na fig. 14) os animais foram expostos ao Contexto A para induzir a labilização da memória. Imediatamente após, os animais receberam a infusão bilateral de Vei ou AM251 (antagonista CB1; 50 pmol/0,2 μ L) no PL e foram tratados com Vei ou CBD (10 mg/kg) por via i.p. Quando expostos ao Teste A após 24 horas, o grupo Vei-CBD apresentou uma menor porcentagem no tempo de congelamento em relação aos respectivos grupos controle, enquanto que o grupo AM251 – CBD não apresentou nenhuma diferença em relação ao grupo AM251 – Vei. Quando expostos ao Teste B nenhuma diferença foi observada. As setas indicam o momento e a via de administração das drogas. O asterisco indica uma diferença significativa ($P < 0,05$) em relação ao grupo controle. Os dados são representados como Média \pm E.P.M. da porcentagem de congelamento. ANOVA de uma via com medidas repetidas (comparações no Contexto A). ANOVA de uma via (Teste B).

5.12 Experimento 12: O bloqueio da enzima de degradação de anandamida no córtex PL bloqueia a reconsolidação da memória de medo ao contexto

Para confirmar que o aumento da disponibilidade de AEA no córtex PL prejudica a reconsolidação da memória de medo ao contexto, 17 ratos previamente condicionados foram alocados em 2 grupos ($n = 8 - 9$ /grupo) e imediatamente após a evocação da memória, receberam a

infusão bilateral de VEI ou URB597 (30 pmol/0,2 μ L) no PL. O URB597 inibe a FAAH, aumentando a disponibilidade de AEA (fonte). A ANOVA com medidas repetidas demonstrou uma interação entre os fatores tratamento e repetição [$F(1,15) = 8,97$; $P = 0,009$]. O teste de post-hoc de Newman-Keuls demonstrou uma diferença entre o grupo URB597 em relação ao VEI durante o Teste A, como mostrado na figura 25. Durante a sessão de evocação ambos os grupos apresentaram uma porcentagem de congelamento semelhante. Para a exposição ao Contexto B a ANOVA de uma via não demonstrou nenhum efeito do tratamento [$F(1,15) = 0,14$; $P = 0,71$]. Em conjunto, esses resultados sugerem que o aumento dos níveis de AEA no córtex PL prejudica a reconsolidação da memória.

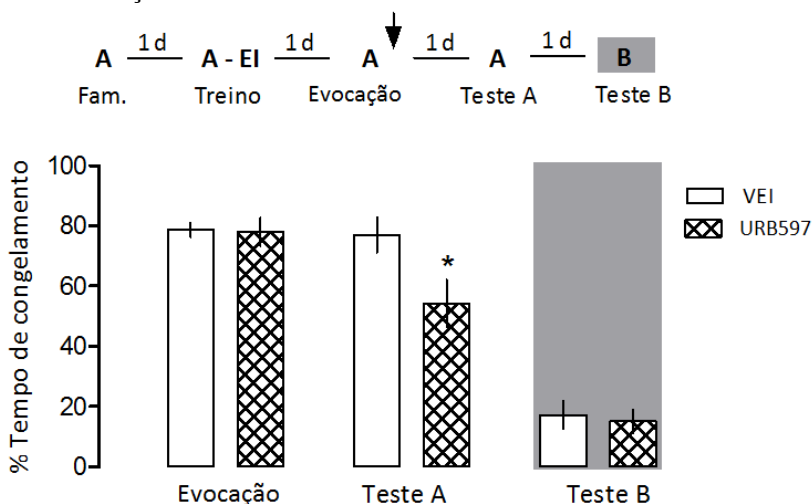


Figura 25: A inibição da degradação da anandamida no córtex PL prejudica a reconsolidação da memória de medo ao contexto. Um dia após a sessão de treino (descrito na fig. 14) os animais foram expostos ao Contexto A para induzir a labilização da memória. Imediatamente após, os animais receberam a infusão bilateral de VEI ou URB597 (inibidor da FAAH; 30 pmol/0,2 μ L) no PL. Quando expostos ao Teste A após 24 horas, o grupo URB597 apresentou uma menor porcentagem no tempo de congelamento em relação ao grupo controle. Quando expostos ao Teste B nenhuma diferença foi observada. A seta indica o momento de administração das drogas. O asterisco indica uma diferença significativa ($P < 0,05$) em relação ao grupo controle. Os dados são representados como Média \pm E.P.M. da porcentagem de congelamento. ANOVA de uma via com medidas repetidas (comparações no Contexto A). ANOVA de uma via (Teste B).

6. Discussão

6.1 Padronização do protocolo de condicionamento e de reconsolidação

Quando expostos ao contexto pareado, os animais condicionados apresentaram uma porcentagem alta de congelamento. Esse perfil de resposta foi mantido ao longo do tempo, concordando com diversos trabalhos que utilizam o treino forte para produzir um condicionamento intenso e duradouro. O protocolo adotado gerou uma memória considerada adaptativa (FANSELOW, 2010; LEE, 2010), uma vez que durante a exposição ao Teste B, os animais apresentaram uma baixa porcentagem de congelamento (GAZARINI *et al.*, 2013).

A inserção de uma etapa de familiarização ao contexto um dia antes do condicionamento facilitou o aprendizado. Segundo Fanselow (2010), enquanto que para o condicionamento ao som, por exemplo, uma etapa de familiarização promove uma inibição latente e, portanto um prejuízo no aprendizado, a familiarização ao contexto promove uma facilitação do condicionamento de medo ao contexto. Assim, o protocolo de treino forte foi padronizado, inserindo a etapa de familiarização um dia antes do treino.

É descrito na literatura que sessões curtas de evocação da memória podem causar a labilização da mesma (BUSTOS, MALDONADO, MOLINA, 2006), tornando - a sensível a diversas classes de drogas, como os inibidores de síntese proteica (NADER, SCHAFE & LEDOUX, 2000; DUVARCI & NADER, 2004) e os benzodiazepínicos (BUSTOS *et al.*, 2006; 2009). De fato, uma sessão de evocação da memória com duração de 3 minutos, seguida da administração de uma dose amnésica de MDZ (1,5 mg/kg), promoveu uma redução duradoura na expressão do congelamento quando os animais foram re-expostos ao contexto pareado, concordando com trabalhos prévios da literatura (BUSTOS *et al.*, 2006; 2009; 2010). Uma vez que benzodiazepínicos prejudicam a extinção de memórias aversivas (HART, HARRIS & WESTBROOK, 2009), pode - se excluir um efeito facilitador da extinção e assumir que o tempo de evocação adotado favorece o processo de reconsolidação. Ainda, pode-se sugerir que no protocolo adotado e de acordo com Eisenbergh *et al.* (2003) que propôs que o traço da memória que (reconsolidação vs extinção) é controlado pelo comportamento após a evocação é aquele susceptível ao agente amnésico. Dessa maneira, concordando com os dados da literatura,

padronizamos o protocolo de reconsolidação de memória de medo ao contexto para as nossas condições experimentais.

6.2 Sobre o efeito do canabidiol na reconsolidação

Em uma típica curva dose em “U”, a administração de CBD imediatamente após a evocação da memória reduziu a resposta de congelamento quando os mesmos animais foram re-expostos ao Contexto A, demonstrando um efeito semelhante à da dose amnésica do MDZ, indicando que o CBD poderia prejudicar a reconsolidação da memória.

Segundo Nader (2004), um critério necessário para considerar um efeito amnésico sobre a reconsolidação, é que tal procedimento deve ser efetivo apenas após a labilização da memória e não quando o engrama não é evocado e labilizado. Dessa maneira, uma vez que a administração de CBD não afetou a memória de medo após a exposição dos animais a um contexto neutro, pode – se considerar que a redução da porcentagem de congelamento observada pelo CBD, administrado após a evocação da memória, ocorreu provavelmente por um bloqueio da reconsolidação.

A administração sistêmica de CBD atenua respostas defensivas condicionadas e não condicionadas (GUIMARAES *et al.*, 1990; LEMOS, RESSTEL & GUIMARAES, 2010). Assim, se a redução do congelamento, observado durante o Teste A, tivesse ocorrido por um efeito antiaversivo do CBD, o mesmo resultado deveria ser observado durante a exposição ao Contexto A, 24 horas após a omissão da evocação da memória. Após a injeção intraperitoneal, o CBD alcança uma concentração máxima no cérebro de ratos em 2 horas, sendo que após 24 horas, a droga não é mais detectada no plasma (DEIANA *et al.*, 2011). Dessa maneira, esses dados confirmam que a redução na expressão de congelamento, visualizada quando os animais são re-expostos ao Teste A, é causada por um efeito amnésico e não antiaversivo residual da droga.

Diversas evidências demonstram que a consolidação e a reconsolidação da memória compartilham algumas características. Uma delas seria a presença de uma janela temporal, com duração de aproximadamente 6 horas e que torna a memória susceptível a ação de interferentes por um período de tempo (PRZBYSLAWSKY, ROULLET & SARA, 1999; BUSTOS, MALDONADO & MOLINA, 2006). Dessa forma, uma vez que a manipulação farmacológica é feita após o término desse período, o efeito farmacológico não é mais observado (NADER, SCHAFE & LEDOUX, 2000; DUDAI, 2004). No presente trabalho, o

efeito do CBD, assim como o do MDZ, foi observado quando administrado apenas imediatamente após a evocação da memória, mas não após 6 horas. Esse padrão de resultado corrobora a natureza temporal da reconsolidação, além de, novamente excluir um possível efeito antiaversivo do CBD nos resultados observados.

O CBD também tem sido associado à facilitação da extinção de uma memória de medo ao contexto (BITTENCOURT, PAMPLONA & TAKAHASHI, 2008; DO MONTE *et al.*, 2013). Como o efeito final de facilitar a extinção e prejudicar a reconsolidação é comportamentalmente semelhante (redução no congelamento frente ao contexto pareado) e, embora o protocolo adotado favoreça a reconsolidação à extinção, seria necessário excluir um possível efeito facilitador do CBD sobre a extinção da memória.

Enquanto a aquisição do condicionamento Pavloviano corresponde ao aumento da resposta condicionada ao EC pareado ao EI, a extinção corresponde a redução da resposta condicionada ao EC na ausência do EI. Esse fato significa que a extinção requer um novo aprendizado, onde uma memória, agora neutra, suprime a memória aversiva original (FANSELOW & PONNUSAMY, 2008), o que dá à extinção a característica de não ser permanente, uma vez que após algumas situações o comportamento condicionado reaparece, caracterizando o termo recuperação espontânea da memória (RESCORLA, 2004; MYERS & DAVIS, 2008). No presente estudo, o efeito do CBD persistiu por até 22 dias após a interferência farmacológica. Esses resultados concordam com trabalhos da literatura que demonstram uma ausência de recuperação espontânea da memória após interferências feitas na reconsolidação de memórias relacionadas à esquiva inibitória e aos condicionamentos contextual, auditivo e olfatório (DUVARCI & NADER, 2004; BUSTOS, MALDONADO & MOLINA, 2006, TAUBENFELD *et al.*, 2009, DO MONTE *et al.*, 2013). Reforçando o efeito do CBD sobre a reconsolidação, também foi observado que, após receberem um choque leve nas patas no Contexto C, o grupo tratado com CBD não apresentou a reinstalação da memória.

A reinstalação da memória foi primeiramente observada por RESCORLA & HETH (1975), quando esses autores determinaram que, a reinstalação é um efeito específico da extinção e que persiste por pelo menos 24 horas, sugerindo que o reaparecimento da resposta de medo frente ao CS não ocorre por uma sensibilização. Embora alguns trabalhos demonstrem que uma memória, cuja reconsolidação foi prejudicada após a administração de algumas drogas, não sofre reinstalação (BUSTOS, MALDONADO, MOLINA 2006; DE

OLIVEIRA ALVARES *et al.*, 2008; TAUBENFELD *et al.*, 2009), outros limitam – se a mostrar um efeito duradouro, sugerindo ausência de recuperação espontânea (DO MONTE *et al.*, 2013). Uma vez que se sugere o uso de fármacos que bloqueiam a reconsolidação para tratamento de transtornos de ansiedade e estresse como o TEPT sendo mais vantajoso do que as terapias de extinção da memória, justamente pela limitação de sofrer recuperação espontânea e reinstalação, de um ponto de vista clínico, seria muito desvantajoso a incerteza sobre o qual real efeito da droga, se seria um facilitador da extinção e não uma droga que bloqueia o processo de reconsolidação.

Com o passar do tempo, as memórias tendem a se tornarem mais resistentes, ou seja, menos susceptíveis a sofrerem intervenções (MILEKIC & ALBERINI, 2002). No entanto, o bloqueio da reconsolidação pelo CBD também foi observado após a evocação de uma memória de 7 dias. Esse resultado concorda com trabalhos que demonstram que uma memória de 7 dias, em ratos, também é susceptível a administração sistêmica de midazolam ou do antagonista dos receptores de glicocorticoide, RU38486, intra-amígdala, nos modelos de condicionamento de medo ao contexto e esquiva ativa, respectivamente (BUSTO, MALDONADO & MOLINA, 2009; TAUBENFELD *et al.*, 2009). Embora não se saiba se o CBD também prejudica a reconsolidação de uma memória remota, sabe-se que para o MDZ prejudicar a reconsolidação de uma memória de 21 ou 36 dias é necessária uma sessão de evocação maior (5 e não 3 minutos) e/ou uma dose maior de MDZ (3 mg/kg; BUSTOS, MALDONADO & MOLINA, 2009), já que essas memórias seriam mais resistentes ao processo de labilização, necessário para a reconsolidação.

Como pode ser observado nesse trabalho, durante a exposição dos animais ao Teste B, não foi observado o fenômeno de generalização, que se caracteriza pela expressão de respostas de defesa mesmo em ambientes neutros e/ou não condicionados e que é comumente observado em pacientes com TEPT (JOVANOVIC *et al.*, 2009; PITMAN *et al.*, 2012).

Assim, o efeito do CBD sobre a reconsolidação foi observado em uma memória formada dentro das faixas adaptativas. No entanto, seria interessante saber se drogas que prejudicam a reconsolidação de memórias adaptativas também interferem com memórias dentro das faixas patológicas. De maneira bastante interessante, Gazarini *et al.* (submetido para publicação; 2014) mostraram que mesmo memórias inapropriadas, induzidas pela hiperativação noradrenérgica durante a etapa de consolidação, podem ter a reconsolidação prejudicada com

administração sistêmica de CBD, quando associado à D-cicloserina, um agonista parcial de receptores glutamatérgico do tipo NMDA que é capaz de facilitar a labilização da memória. Como consequência do prejuízo da reconsolidação dessa memória, o CBD também atenuou a generalização. Em conjunto, esses resultados reforçam a ideia do uso do CBD, para o tratamento dos aspectos cognitivos de transtornos do estresse como TEPT, através do bloqueio da reconsolidação (GAZARINI *et al.*, 2014). No entanto, vale ressaltar, que o CBD também atenua a ansiedade (CAMPOS *et al.*, 2012) um sintoma bastante comum no TEPT (YEHUDA *et al.*, 2010).

Além disso, o bloqueio da reconsolidação pode ser um alvo para outras doenças psiquiátricas, entre elas, destaca – se a dependência às drogas (TRONSON & TAYLOR, 2013). Nesse contexto, em um estudo conduzido com fumantes, foi observado que o CBD reduziu em 40 % o consumo de cigarros, um efeito que foi mantido após o término do tratamento com CBD. Apesar de esse trabalho não ter investigado como o CBD produziu esse efeito, os autores sugerem que pode ter sido pelo bloqueio da reconsolidação (MORGAN *et al.*, 2013).

6.3 O mecanismo de ação do canabidiol na reconsolidação

Múltiplos mecanismos de ação têm sido propostos para os efeitos comportamentais do CBD (IZZO *et al.*, 2009), incluindo a facilitação da transmissão mediada pelos receptores CB1 e 5-HT_{1A} (BITTENCOURT, PAMPLONA, TAKAHASHI, 2008; MOREIRA, AGUIAR, GUIMARAES, 2006; CAMPOS & GUIMARÃES, 2008; RESSTEL *et al.*, 2009). Enquanto que o efeito sobre o sistema endocanabinoide envolve a inibição da enzima de degradação da AEA, a FAAH (BISOGNO *et al.*, 2001; IZZO *et al.*, 2009), a ação sobre o sistema serotoninérgico ocorre pela ativação direta dos receptores 5-HT_{1A} (RUSSO *et al.*, 2005).

No presente estudo, o pré-tratamento com AM251, mas não com WAY100635, foi capaz de bloquear o efeito amnésico do CBD, corroborando os resultados que demonstram que a facilitação da extinção causada pelo CBD depende da ativação dos receptores CB1 (BITTENCOURT, PAMPLONA & TAKAHASHI, 2008). Além de concordar com os trabalhos que demonstram o papel dos receptores CB1 hipocampusais, para a labilização (SUZUKI *et al.*, 2004; 2008) e dos receptores CB1 presentes no hipocampo, amígdala e córtex para a re-estabilização da memória (LIN, MAO & GEAN, 2006; KOBILO, HAZVI & DUDAI, 2007; DE OLIVEIRA ALVARES *et al.*, 2008;

SUZUKI *et al.*, 2008). De acordo com os nossos resultados, alguns trabalhos tem demonstrado o papel da transmissão endocanabinoide em estruturas encefálicas específicas na reconsolidação de memórias aversivas. O WIN55,212-2, um agonista dos receptores CB1, prejudicou a reconsolidação do sobressalto potencializado pelo medo, quando administrado nos núcleos da amígdala (LIN, MAO & GEAN, 2006), a anandamida, o agonista endógeno CB1, prejudicou a memória de medo ao contexto quando injetado no hipocampo dorsal de ratos e camundongos (DE OLIVEIRA ALVAREZ *et al.*, 2008; SUZUKI *et al.*, 2008) e o WIN 55,212-2 prejudicou a memória condicionada ao gosto quando injetado no córtex insular (KOBILLO, HAZVI & DUDAI, 2007). De maneira oposta, o bloqueio dos receptores CB1 hipocampais, com AM251, potencializou a reconsolidação da memória de medo a contexto em ratos (DE OLIVEIRA ALVAREZ *et al.*, 2008). Contrário a esse último trabalho, também foi demonstrado que, o bloqueio dos receptores CB1 na amígdala prejudica a reconsolidação de uma memória de medo ao contexto em ratos (BUCHERELLI *et al.*, 2006). Embora contrário a grande parte dos estudos sobre reconsolidação e sistema endocanabinoide, essa diferença pode ter ocorrido por diferenças nos protocolos (ex., intensidade do treino) utilizados e as áreas onde a droga foi administrada (hipocampo vs amígdala).

Além de mediar a reconsolidação de memórias aversivas, a transmissão endocanabinoide também participa da reconsolidação de memórias hedônicas (DE CARVALHO *et al.*, 2013). No entanto, esses resultados contrastam com o que é observado nas memórias aversivas. Nesse contexto, foi demonstrado que, o bloqueio sistêmico dos receptores CB1 com SR141617A prejudicou a reconsolidação da memória de preferência ao lugar, induzida pela metanfetamina, nicotina e morfina (YU *et al.*, 2009; FANG *et al.*, 2011; DE CARVALHO *et al.*, 2013), enquanto que a inibição da FAAH, a enzima que degrada a anandamida, pela administração sistêmica de URB597 produziu efeito oposto (DE CARVALHO *et al.*, 2013). O uso do WIN55212,2 um agonista CB1/CB2 potente, no entanto, não alterou a resposta comportamental dos animais (DE CARVALHO *et al.*, 2013). Como a inibição da FAAH aumenta os níveis de AEA, a qual é uma agonista parcial CB1, mas que também se liga nos receptores TRPV1 (DI MARZO & DE PETROCELLIS, 2012), pode-se propor um efeito para o URB597 nesse caso, independente de CB1.

Em conjunto, pode-se afirmar que o sistema endocanabinoide participa da reconsolidação de memórias aversivas e hedônicas principalmente por uma modulação nos receptores CB1. Poucos

trabalhos avaliaram o papel dos receptores CB2, sendo que foi demonstrado uma ausência de função desse receptor no processo de re-estabilização das memórias (DE CARVALHO *et al.*, 2013). Nesse contexto, é necessário que mais trabalhos sejam feitos para esclarecer o papel dos receptores CB2 na reconsolidação de memórias aversivas e hedônicas.

Embora os receptores 5-HT_{1A} também participem da reconsolidação de memórias aversivas (OGREN *et al.*, 2008) e diversos trabalhos demonstram que os efeitos antiaversivos do CBD são mediados pelos receptores 5-HT_{1A} (RUSSO *et al.*, 2005; CAMPOS *et al.*, 2012), o WAY100635, em uma dose que previne o efeito ansiolítico do CBD (RESSTEL *et al.*, 2009), não preveniu o efeito amnésico do CBD nas condições testadas. Como apenas uma dose do antagonista foi utilizada, não podemos descartar um efeito do CBD sobre esse sistema. No entanto, é curioso que os efeitos cognitivos do CBD pareçam ser mediados pelos receptores CB1 (BITTENCOURT, PAMPLONA & TAKAHASHI, 2008, DO MONTE *et al.*, 2013; KOWAL *et al.*, 2013) enquanto que os efeitos emocionais seriam mais relacionados à transmissão serotoninérgica (CAMPOS *et al.*, 2012). Assim, surge o questionamento: será que o mecanismo de ação do CBD depende da origem da tarefa, de forma que tarefas “puramente emocionais” recrutariam o sistema serotoninérgico, enquanto que as emocionais, mas com o componente aprendido/cognitivo, recrutariam o sistema endocanabinoide? Além disso, um efeito sobre os receptores TRPV1 não pode ser descartado (BISOGNO *et al.*, 2001).

6.4 A evocação da memória aumenta a expressão de Zif268 no córtex pré-límbico e córtex cingulado

A plasticidade neural é uma propriedade do sistema nervoso que permite que as células respondam dinamicamente aos estímulos, sendo uma das bases de funções cognitivas como os processos complexos de aprendizagem e memória (BAUMGARTEL *et al.*, 2009). No presente trabalho, foi observado um aumento da expressão da proteína Zif268 no córtex pré-límbico e cingulado, mas não no infralímbico, 1 hora após a evocação da memória.

Embora os resultados dos trabalhos que avaliaram a expressão de Zif268 e/ou outros marcadores de plasticidade sináptica no CPFm sejam contraditórios, nossos resultados concordam, em parte, com o trabalho de Thomas *et al.* (2002), que observou um aumento da expressão de Zif268 no CPFm de ratos, principalmente no CC, após a evocação da

memória de medo ao contexto, mas não ao som. Enquanto que Hall *et al.* (2001) observou um aumento na expressão de Zif268 no CC após a evocação de uma memória remota, mas não recente. Dessa maneira, os resultados desse trabalho ampliam o conhecimento sobre a expressão dessa proteína no CPFm: além de ser expressa no CC, um aumento também ocorre no PL, mas não no IL.

Em camundongos, foi mostrado uma ativação diferencial de genes de expressão imediata no CPFm. Os autores observaram um aumento de Arc apenas na amígdala e hipocampo após uma sessão curta de evocação da memória, que levaria à reconsolidação, enquanto que apenas após uma sessão de extinção, foi observado um aumento na expressão de CREB no CPFm (MAMYA *et al.*, 2009), sugerindo que o CPFm não participaria da reconsolidação, no entanto, esse trabalho não avaliou a expressão do Zif268 e outros marcadores nessas áreas. De fato Lee *et al.* (2004) mostrou a importância da expressão desse gene no hipocampo dorsal de ratos para a reconsolidação de uma memória de medo contextual. Quando o *antisense* para o gene do Zif268 foi injetado no hipocampo na etapa de consolidação da memória, nenhum prejuízo de aprendizado foi observado, entretanto, a administração logo depois da evocação da memória bloqueou o a etapa de reconsolidação. O oposto ocorreu quando o *antisense* para o gene do BDNF foi usado (LEE, EVERITT & THOMAS, 2004), dessa maneira foi proposto que a indução da expressão do Zif268 seria mais importante para a reconsolidação da memória. Esse mesmo padrão de resultado também foi demonstrado para memórias neutras (SOULÉ *et al.*, 2008). Nesse contexto, foi demonstrado um aumento da expressão de Zif268 no CC e no PL, sugerindo a participação dessas duas regiões na etapa de reconsolidação da memória (TSE *et al.*, 2011).

No cérebro de mamíferos, existe uma expressão basal de Zif268, a qual está relacionada com a manutenção da atividade sináptica “normal” (WORLEY *et al.*, 1991; HERDEGEN & LEAH, 1998). Essa expressão basal tem sido observada no córtex visual, somatosensório e nas lâminas IV, V e VI, as quais compõe parte do CPFm (KACZMAREK & CHAUDHURI, 1997). Da mesma maneira, os neurônios piramidais da região CA1 do hipocampo de ratos também apresentam uma expressão basal dessa proteína (DESJARDINS *et al.*, 1997). A expressão basal de Zif268 em áreas como o neocórtex e o hipocampo sugere a importância dessa proteína para as funções mediadas por essas duas regiões, entre elas as funções de aprendizado e memória (KNAPSKA & KACZMAREK, 2004).

A expressão de Zif268 é induzida pelo aumento do cálcio citosólico (GOSH *et al.*, 1994), sendo essa expressão necessária para os processos de LTP, principalmente para a persistência da LTP (KNAPSKA & KACZMAREK, 2004) uma fase que de fato, depende da ativação de genes de expressão imediata (SQUIRE & DAVIS, 1981; FREY *et al.*, 1988). Além disso, o Zif268 é necessário para a formação do complexo ubiquitina-proteassoma, o qual degrada algumas das proteínas no momento da evocação da memória causando a labilização da memória (LEE *et al.*, 2008).

Se a labilização depende da evocação da memória, parece razoável que regiões importantes para evocação da memória participem do processo de reconsolidação da memória. O papel do córtex PL na evocação da memória é bem estabelecido (BURGOS – ROBLES, VIDAL – GONZALEZ, QUIRK, 2009; PENDYAM *et al.*, 2013; GONZALEZ *et al.*, 2013). Diversos estudos tem mostrado a importância dessa área para a expressão de comportamentos condicionados e não condicionados (LISBOA *et al.*, 2010a; 2010b; STERN *et al.*, 2010; FOGAÇA *et al.*, 2013), e, mais recentemente, tem-se mostrado a importância dessa região para a consolidação de memórias: essa função foi demonstrada em camundongos, no condicionamento de medo ao contexto (CHOI *et al.*, 2012) e em ratos, no protocolo de esquivas inibitória (GONZALEZ *et al.*, 2013). Nesse contexto, alguns trabalhos demonstram a importância das conexões do córtex PL com o hipocampo dorsal para a formação da LTP (LIM *et al.*, 2010), um dos mecanismos moleculares da consolidação da memória. Em conjunto, esses resultados sugerem a importância do córtex PL no processo de reconsolidação da memória.

6.5 A administração de CBD imediatamente após a evocação da memória reduz a expressão de Zif268 no córtex pré-límbico e córtex cingulado

Lemos *et al.* (2010) mostraram que o efeito antiaversivo do CBD é mediado por uma redução da ativação neuronal do córtex PL, caracterizada pela redução na expressão da proteína Fos nessa região. No presente trabalho, foi demonstrado que o CBD reduz a expressão de Zif268 no CC e no PL. Uma vez que o aumento da expressão de Zif268 está intimamente relacionado com o processo de reconsolidação da memória (LEE, EVERITT & THOMAS, 2004; BESNARD, LAROCHE & CABOCHE, 2013), o efeito do CBD sobre a expressão dessa proteína

reforça os resultados comportamentais que demonstram que a administração de CBD prejudica a reconsolidação.

Embora diferente em termos de metodologia adotada, esse resultado concorda com os trabalhos que observaram um prejuízo na reconsolidação da memória de medo ao contexto e de objeto após a administração local do *antisense* para o Zif268 (BOZON, DAVIS & LAROCHE, 2003; LEE, EVERITT & THOMAS, 2004). Além disso, esse resultado confirma em parte, a participação do CPFm no processo de reconsolidação de memória de medo.

O Zif268 é uma proteína nuclear que possui 3 anéis de zinco, e sua expressão, que está ligada ao aumento da atividade celular, pode induzir ou reprimir a ativação de outros genes que irão regular a plasticidade sináptica necessária para a reconsolidação. Sabe-se que o Zif268 interage com o fator de transcrição NFkB, (CHAPMAN & PERKINS, 2000) cuja indução é necessária para que, após a evocação, a memória sofra o processo de reconsolidação e não extinção (DE LA FUENTE *et al.*, 2011). Nesse contexto, já foi demonstrado que o CBD reduz a expressão de algumas proteínas que contém o zinco bem como a expressão de NFAT, que ao contrário do NFkB, favorece a extinção da memória, sugerindo esses efeitos como um dos mecanismos pelos quais o CBD prejudica a reconsolidação da memória.

De maneira contrária ao efeito encontrado com o CBD, a administração aguda de THC aumenta os níveis de Zif268 no córtex e hipocampo de camundongos testados no labirinto aquático de Morris (BOUCHER *et al.*, 2009), já o tratamento crônico com THC reduz a expressão dessa proteína no córtex (LAZENCKA *et al.*, 2013). No entanto, vale ressaltar que, além das diferenças de protocolos e linhagens adotadas, o CBD não é um agonista CB1 direto, e que apesar do AM251 ter bloqueado o efeito comportamental do CBD, a redução da expressão de Zif268 não necessariamente pode ser justificada por esse mesmo mecanismo.

Sendo o Zif268 uma proteína necessária para a estabilização da plasticidade sináptica (DAVIS, BOZON & LAROCHE, 2003), pode-se supor que uma redução em sua expressão pode prejudicar a reconsolidação, cuja função é re-estabilizar os circuitos sinápticos que haviam se tornado lábeis após a evocação da memória (LEE *et al.*, 2008; KAANG *et al.*, 2009). Sendo assim, podemos supor que, uma vez que o CBD reduz a expressão de Zif268, o prejuízo que o mesmo causa na reconsolidação da memória pode ocorrer por uma “falha” na etapa de re-estabilização daquele mesmo circuito sináptico formado na consolidação, o que causaria um enfraquecimento do traço de memória.

Em conjunto, esses dados sugerem que o bloqueio da reconsolidação atenua ou “apaga” a memória original.

Os receptores CB1, presentes principalmente na pré-sinapse de neurônios glutamatérgicos e GABAérgicos e acoplados à proteína G inibitória, reduzem a liberação de neurotransmissores pela pré-sinapse quando ativados (HOWLETT, 2002). Dessa maneira, poderíamos supor que o efeito do CBD sobre a expressão do Zif268 pode ter sido mediado pela redução da excitabilidade pós-sináptica por uma consequente redução da liberação de glutamato pela pré-sinapse. De fato, a indução da expressão de Zif268 depende da ativação de receptores glutamatérgicos e altos níveis de cálcio (GHOSH *et al.*, 1994; CONDORELLI *et al.*, 1994). Entretanto, relatos da literatura demonstram que os receptores CB1 estão localizados principalmente em interneurônios GABAérgicos, no hipocampo e no córtex de roedores (MARSICANO & LUTZ, 1999), fato que leva à conclusão de que a ativação CB1 nessas regiões produz um efeito excitatório. No entanto, apesar de quantitativamente haver um predomínio de receptores CB1 em interneurônios corticais, sabe-se que qualitativamente o funcionamento desses receptores é deficiente, quando comparado ao funcionamento dos receptores CB1 presentes nos terminais glutamatérgicos do córtex (RUHELE *et al.*, 2013). Isso quer dizer que a ativação, mesmo que em uma quantidade menor, dos receptores CB1 presentes nos terminais glutamatérgicos do córtex levaria a uma redução da excitabilidade pós-sináptica, devido ao acoplamento deficiente dos receptores CB1 aos interneurônios GABAérgicos à proteína G (RUHELE *et al.*, 2013). De fato, na amígdala lateral, a sinalização CB1 em neurônios glutamatérgicos se sobrepõe a sinalização CB1 dos terminais GABAérgicos, reduzindo a excitabilidade neural (AZAD *et al.*, 2003). Além disso, a atividade tônica e fásica do sistema endocanabinoide é controlada de maneira diferente: enquanto a fase tônica é mediada principalmente pela ativação CB1 presente nos terminais GABAérgicos, a atividade fásica parece depender da ativação CB1 presente nos terminais glutamatérgicos (ROBERTO *et al.*, 2010).

É mostrado que o efeito do CBD sobre o sistema canabinoide não é mediado por uma ligação direta no receptor CB1 e sim por um aumento de nos níveis AEA (BISOGNO *et al.*, 2001; LEWEKE *et al.*, 2013) que além de ligar-se ao receptor CB1, também é um agonista dos receptores TRPV1 (BISOGNO *et al.*, 2001). Esses receptores estão presentes na pós-sinapse de neurônios do córtex, sendo que seu agonista, a capsaicina, promove um aumento da excitabilidade neural, causando um aumento do influxo de cálcio, favorecendo a liberação de

glutamato e os mecanismos de LTP. No entanto, tem-se mostrado que a AEA, após ligar-se ao receptor TRPV1, causa uma redução na excitabilidade pós-sináptica, levando a uma redução nos níveis de cálcio e, em alguns casos, promove a depressão de longa duração (do termo em inglês: *long term depression*; PUENTE *et al.*, 2011). Nesse caso, sugere-se que a AEA não age como um neurotransmissor atípico, reduzindo a liberação de neurotransmissores da pré - sinapse e sim, reduzindo a excitabilidade neural pós - sináptica de maneira autócrina (PUENTE *et al.*, 2011). Pode-se sugerir então, que o CBD, através da elevação dos níveis de AEA, que estaria agindo nos receptores TRPV1, poderia causar uma redução nos níveis de cálcio e consequentemente reduzir a expressão de Zif268 nos neurônios do córtex.

Como já citado, a administração de CBD reduz a expressão da proteína Fos no córtex PL (LEMOS, RESSTEL & GUIMARAES, 2010). Assim como a Fos, o Zif268 é uma proteína reguladora e não efetora, ao contrário do BDNF e da Arc (DAVIS *et al.*, 2003). Dessa maneira, a indução do Zif268 modula a expressão de uma grande parcela de proteínas que também participam do aprendizado e memória. De destaque nesse contexto pode-se citar a redução na expressão de proteínas estruturais, como a beta arrestina-1 e efetoras, como a homer (BAUMGARTEL *et al.*, 2008) em camundongos *knockout* para o zif268 em tecido cortical.

Obviamente, uma ampla gama de proteínas modula a plasticidade sináptica e a reconsolidação como, por exemplo, a proteína Arc e quinases, como a mTOR (GAFFORD *et al.*, 2011; JOBIM *et al.*, 2012), cujo efeito sobre a plasticidade é mediado pela indução de modificações translacionais. Já se sabe que, a rapamicina, um bloqueador da mTOR, prejudica a reconsolidação de memórias aversivas por não permitir que ocorram as mudanças pós-sinápticas induzidas por essa proteína (LI *et al.*, 2013). Em cultura de células humanas não neuroniais, o CBD inibe a via da mTOR (SHRIVASTAVA *et al.*, 2011). Tanto a redução, como o aumento da sinalização da via da mTOR estão associadas a prejuízos de memória. Ao contrário do CBD, tem sido demonstrado que a ativação CB1 pelo THC ou pela AEA aumenta os níveis de mTOR, prejudicando a consolidação da memória (PUIGHERMANAL *et al.*, 2012). Dessa maneira, não podemos descartar que o efeito do CBD sobre a reconsolidação também pode ser mediado pela modulação da mTOR e de outras proteínas. Se considerarmos que, ao longo do tempo e além da mTOR e do Zif268, proteínas como a CAMKII apresentam uma função diferenciada na etapa de reconsolidação (DA SILVA *et al.*, 2013), cabe ainda testarmos qual o efeito da administração de CBD ao

longo da escala temporal da etapa de reconsolidação, bem como, qual o efeito do CBD sobre a expressão desses outros mediadores da reconsolidação.

6.6 A inativação do córtex pré-límbico prejudica a reconsolidação da memória de medo ao contexto

A inativação temporária do córtex PL, imediatamente após a evocação da memória, reduziu a resposta de congelamento dos animais quando expostos ao Teste A, indicando um efeito sobre a reconsolidação da memória.

Tradicionalmente, associa-se a atividade do córtex PL com a expressão de comportamentos de defesa e com a evocação das memórias (STERN *et al.*, 2010; CORCORAN & QUIRK; 2007; GONZALEZ *et al.*, 2013). Uma vez que o Teste A ocorreu 24 horas após a infusão de muscimol e que o seu efeito dura em média 120 minutos (MARTIN *et al.*, 1991), pode-se excluir que a inativação influenciou diretamente a expressão/evocação da memória, bem como os processos atencionais, que também dependem da atividade do PL, no dia seguinte (SHARPE & KILLCROSS, 2012; TOTAH *et al.*, 2013).

Quando a evocação da memória foi omitida e o córtex PL inativado, nenhuma diferença entre o grupo inativado e o controle foi observada no Teste A. Confirmando que, de fato, a inativação do PL é temporária, pois a integridade do mesmo é necessária para a evocação, além de confirmar o que foi sugerido e mostrado por NADER (2004): é necessário que a memória seja evocada e labilizada para então sofrer a reconsolidação.

Uma vez a atividade do CPFm está amplamente relacionada com a extinção de memórias aversivas (HEIDBREDE & GROENEWEGEN, 2006; BOUTON *et al.*, 2006), poder - se - ia supor que o efeito da inativação do PL ocorreu por uma facilitação da extinção. Embora o protocolo utilizado no presente trabalho favoreça a reconsolidação (GAZARINI *et al.*, 2013), ao mostrar que o efeito da inativação do PL sobre a resposta de congelamento é duradoura e essa memória não sofre reinstalação, foi confirmado que a atividade do PL é necessária para a reconsolidação da memória de medo ao contexto.

Esse resultado concorda com resultados de trabalhos que demonstram que a transmissão noradrenérgica do PL é importante para a reconsolidação de uma memória de medo condicionada ao odor (DO MONTE *et al.*, 2013) e que na tarefa de reconhecimento de objeto a inibição da síntese proteica, o bloqueio dos receptores de glutamato do

tipo NMDA com AP-V, dos receptores de dopamina do tipo 1 e ou de sua via de sinalização intracelular na porção ventromedial do CPFm prejudicam a reconsolidação dessa memória (AKIRAV & MAROUN, 2006; MAROUN & AKIRAV, 2009). Embora esses autores não diferenciem o PL do IL, esses trabalhos sugerem a importância do CPFm para a reconsolidação.

De maneira contrária, foi mostrado que o bloqueio dos receptores adrenérgicos do tipo beta no córtex PL, após a evocação de uma memória hedônica, não alterou a resposta comportamental quando os animais condicionados à preferência de lugar com cocaína foram re-expostos a esse teste (OTIS *et al.*, 2013). No entanto, a administração de propranolol no PL antes da evocação, como esperado, atenuou a expressão da preferência. No entanto, curiosamente essa redução foi duradoura, ou seja, além de causar uma redução na expressão do comportamento de maneira aguda, os mesmos animais apresentaram uma redução no comportamento de preferência no dia seguinte (OTIS *et al.*, 2013). Se considerarmos que interferências na expressão dependem da presença da droga, podemos sugerir que a administração de propranolol no PL, antes evocação, pode ter prejudicado a reconsolidação, já que no protocolo adotado por esses autores a sessão de evocação da memória dura 15 minutos e sabe-se que a transmissão noradrenérgica é crucial para as fases iniciais da evocação. Assim apenas o bloqueio da transmissão noradrenérgica no início da evocação poderia prejudicar de maneira duradoura aquela memória.

Também tem sido proposto que interferências antes da evocação podem potencializar a memória, sem necessariamente recrutar os mecanismos da reconsolidação (MOCHNY *et al.*, 2013; GIACHERO *et al.*, 2013). Como proposto por Dudai (2002), a evocação da memória aversiva é um evento estressante. Assim, de maneira especulativa, podemos propor que ao atenuar o efeito estressante da evocação, utilizando o propranolol em uma área especificamente importante para a evocação e expressão da memória, alguma atualização pós - evocação dessa memória poderia ter sido prejudicada. Nesse contexto, é necessário investigar se além do PL participar dos mecanismos de reconsolidação, será que essa região não seria crucial para a manutenção da memória? Ou mesmo, para as atualizações da memória feitas após a evocação?

Recentemente foi demonstrado que a fase de reconsolidação, ao contrário da consolidação da memória, recruta os receptores do tipo alfa-1, além dos adrenérgicos do tipo beta (GAZARINI *et al.*, 2013). De maneira bastante interessante, a expressão de receptores alfa no CPFm,

principalmente no CC e no PL, é muito maior do que a expressão de receptores beta (SANTANA *et al.*, 2012), sugerindo que talvez o córtex PL também possa ser recrutado de maneira diferencial na consolidação e na reconsolidação. De fato, o trabalho de DO MONTE *et al.* (2013) mostrou que o bloqueio dos receptores alfa – 1 com prazosin no córtex PL prejudica a reconsolidação.

Em 2009, Peters e colaboradores propuseram que, assim como a atividade do PL é necessária para a expressão do medo, o CC funcionaria no mesmo sentido, denominando ambos de *sítios ativadores do medo*, enquanto que o IL, por seu papel na formação da extinção, seria denominado então de *sítio inibidor do medo*. De fato, nas nossas condições experimentais, a inativação do IL após a evocação da memória não alterou a resposta de congelamento dos animais quando re-expostos ao Contexto A.

Corroborando a idéia de que córtex PL e CC teriam funções semelhantes no controle do medo, Nader & Einarsson (2012) mostraram que a inibição da síntese proteica no CC prejudica a reconsolidação de uma memória de medo contextual em ratos, um resultado muito semelhante ao verificado nesse trabalho, mas com a inativação do PL. Em conjunto, esses resultados nos remetem à teoria proposta por Peters *et al.* (2009), sugerindo que além do PL e do CC atuarem no mesmo sentido quando se trata da expressão do medo, essas duas partes do CPFm também exerceriam papel semelhante no processo de reconsolidação de memórias aversivas.

O córtex PL envia e recebe projeções glutamatérgicas para os núcleos da amígdala basolateral, que conferem a valência do estímulo (por ex.: aversivo; MCDONALD, 1998) e para o hipocampo, o qual é necessário para a informação contextual e temporal (VERTES 2006; HOOVER & VERTES, 2007). Com base nesse circuito neural, pode-se especular que inativando o PL após a evocação da memória, consequentemente ocorreria uma atenuação da excitação que o PL faz sobre a amígdala e o hipocampo, áreas que modulam a reconsolidação e manutenção de memórias carregadas com uma valência emocional negativa (NADER, SCHAFE, LEDOUX, 2000, DEBIEC, LEDOUX & NADER, 2002; LEE, EVERITT & THOMAS, 2004, LEE, MILTON, EVERITT, 2006; TRONSON *et al.*, 2006; DE OLIVEIRA ALVARES *et al.*, 2008; REHBERG *et al.*, 2010; GIACHERO *et al.*, 2013). Além disso, esses resultados sugerem mais uma coincidência de eventos entre a consolidação e reconsolidação de memórias aversivas: bem estabelecido na literatura é o papel da amígdala e hipocampo na consolidação e

reconsolidação (DEBIEC & LEDOUX, 2004; DEBIEC, NADER & LEDOUX, 2004); recentemente tem-se mostrado que o PL e o CC exercem uma função semelhante também nessas duas etapas (EINERSSON & NADER, 2012; STERN *et al.*, 2014).

6.7 A atividade do córtex PL modula a reconsolidação de memórias remotas

Enquanto memórias recentes são facilmente moduladas, as mais antigas, ou remotas, são mais estáveis e menos susceptíveis a sofrerem intervenções (NADER, SCHAFE & LEDOUX, 2000; SUZUKI *et al.*, 2004). Grande parte dos trabalhos que abordam as diferenças entre memórias recentes e remotas concordam que a atividade hipocampal é mais importante para as memórias recentes (KIM & FANSELOW, 2000) e que com o passar do tempo, o traço de memória se torna mais dependente do neocórtex e menos dependente do hipocampo, caracterizando uma “realocação” das estruturas encefálicas engajadas no processamento das memórias (QUINN *et al.*, 2010). Por essa razão, memórias remotas seriam alocadas principalmente no neocórtex, tornando a memória resistente a interferências feitas no hipocampo.

No presente trabalho, a inativação do PL após a evocação de uma memória remota (21 dias) prejudicou a reconsolidação. Consistente com o nosso resultado é o trabalho que demonstra que a inibição da síntese proteica com anisomicina no CC também prejudicou a reconsolidação de uma memória remota (EINARSSON & NADER, 2012). Reforçando o nosso achado estão os resultados que demonstram que o PL e o CC são necessários para a evocação da memória remota no protocolo de condicionamento feito em ratos que recebem choques nos olhos (TAKEHARA, KAWAHARA & KIRINO, 2003) e durante uma tarefa espacial no labirinto de 5 braços, em camundongos (MAVIEL *et al.*, 2004) e que essa evocação é acompanhada de um aumento na expressão de Zif268 e c-Fos no PL e no CC (MAVIEL *et al.*, 2004).

6.8 O bloqueio dos receptores CB1 no córtex PL previne o efeito do canabidiol sobre a reconsolidação da memória

Os receptores CB1 são amplamente expressos em regiões encefálicas importantes para a reconsolidação, como o hipocampo, amígdala e córtex pré-frontal medial (HERKENHAM *et al.*, 1991; DEBIEC, LEDOUX & NADER, 2002; LEE *et al.*, 2004; AKIRAV & MAURON, 2006; DEBIEC *et al.*, 2006), sugerindo essas regiões como

possíveis alvos da ação do CBD. O bloqueio dos receptores CB1 do córtex PL imediatamente após a evocação da memória aboliu o efeito do CBD sobre a reconsolidação. Esse resultado corrobora nosso resultado anterior que demonstra que um dos mecanismos pelos quais o CBD prejudica a reconsolidação da memória é pela redução da atividade do córtex PL, caracterizada pela redução na expressão de Zif268. Além disso, corrobora os dados de imunohistoquímica e de inativação do PL que sugerem a participação dessa região do CPFm na etapa de reconsolidação da memória.

Como o efeito antiaversivo do CBD depende da atividade do córtex PL (LEMONS, RESSTEL & GUIMARAES, 2010), embora dependa da ativação dos receptores de serotonina 5-HT_{1A} dessa mesma região (FOGAÇA *et al.*, 2013), o presente trabalho também demonstra que o córtex PL pode ser o substrato neural dos efeitos cognitivos do CBD.

A exposição ao contexto condicionado gera uma resposta de estresse. Nesse caso, sabe-se que ocorre a liberação massiva de endocanabinoides no cérebro, entre eles a AEA. Quando o CBD é administrado sistemicamente, acredita-se que ocorra uma inibição da enzima FAAH, que degrada a AEA, aumentando a ação desse transmissor e, consequentemente, a ativação de receptores CB1 (BISOGNO *et al.*, 2001). Como já mencionado, a maioria dos receptores CB1 das regiões corticais está expressa em terminais GABAérgicos, no entanto a ativação CB1 nos terminais glutamatérgicos é mais eficiente (RUEHLE *et al.*, 2013). Dessa maneira, pode-se sugerir que o aumento de AEA no PL estaria ativando os receptores CB1 dos terminais pré-sinápticos glutamatérgicos e reduzindo, assim, a ativação da pós-sinapse. A redução da atividade pós-sináptica pode causar um efeito semelhante ao da inativação do PL, com uma consequente redução da ativação da amígdala basolateral e hipocampo dorsal. Assim, embora o efeito sistêmico do CBD sobre a reconsolidação tenha sido abolido por completo pelo bloqueio dos receptores CB1 corticais, não se pode descartar a participação dessas outras áreas no efeito sistêmico do CBD. De acordo com essa hipótese, foi demonstrado que a administração sistêmica do agonista CB1, CPP55940, reduziu a atividade das ondas teta hipocampais e gama do PL, reduzindo de maneira geral o sincronismo que há entre essas duas regiões (KUCEWICZ *et al.*, 2011). Experimentos *in vitro* também mostraram que o CBD reduz o potencial de ação espontâneo em culturas de neurônios primários hipocampais de ratos, da mesma

maneira que os agonistas CB1 WIN55,212 e THC, além de reduzir a transmissão sináptica dessas células, caracterizada pela redução do potencial pós-sináptico excitatório. Em ambos os casos, o efeito do CBD foi revertido pela administração do antagonista CB1 AM251, do agonista inverso LY320135 e do antagonista 5-HT_{1A} WAY100135 (LEDGERWOOD *et al.*, 2011).

De maneira semelhante ao CBD, a administração de AEA no hipocampo dorsal de ratos prejudica a reconsolidação da memória de medo ao contexto, enquanto que bloqueio desses receptores potencializa a re-estabilização da memória (DE OLIVEIRA ALVAREZ *et al.*, 2008), embora os receptores CB1 nessa região também estejam localizados principalmente nos interneurônios GABAérgicos (MACKIE, 2005). Também foi demonstrado em outros modelos que o agonista CB1 WIN55,212 prejudicou a reconsolidação quando administrado nos núcleos da amígdala (LIN *et al.*, 2006) e no córtex insular (KOBILLO, HAZVI & DUDAI, 2007).

Nas nossas condições, a dose do antagonista AM251 foi subefetiva, uma vez que dados ainda não publicados de nosso grupo demonstram que doses maiores de AM251 causam a potencialização da memória de medo e/ou generalização (GAZARINI *et al.*, dados não publicados), fato que não foi observado quando os animais foram expostos ao Teste B.

Além disso, na pós-sinapse de neurônios piramidais do córtex estão presentes os receptores TRPV1 (TÓTH *et al.*, 2005). Nesse contexto, já foi demonstrado que o aumento da AEA pode ativar esses receptores e causar uma redução da excitação pós-sináptica e causar LTD (PUENTE *et al.*, 2011). Como o processo de reconsolidação é um processo dependente de plasticidade, a indução tanto de LTD como de LTP podem explicar porque uma droga prejudica ou potencializa a reconsolidação de uma memória.

Em humanos, a administração de CBD está associada com um aumento do fluxo sanguíneo no giro parahipocampal esquerdo e uma redução na amígdala, hipocampo e córtex cingulado posterior (CRIPPA *et al.*, 2004). Estudos de neuroimagem funcional encontraram evidências que demonstram uma atenuação no nível de oxigenação sanguínea na amígdala e córtex cingulado anterior em resposta à apresentação de faces que causam medo, combinada com a redução dos níveis de ansiedade subjetiva (FUSAR-POLI *et al.*, 2009) e que o CBD também causou uma redução na conectividade funcional dessas duas áreas (FUSAR-POLI *et al.*, 2009). Esses e outros estudos sugerem que os efeitos emocionais e cognitivos do

CBD são mediados pelo córtex cingulado anterior (FUSAR-POLI *et al.*, 2009; KOWAL *et al.*, 2013). Como descrito anteriormente, a porção dorsal do córtex cingulado anterior de primatas humanos e não humanos, corresponde ao córtex PL de roedores (MCDONALD 1998; STEFANACCI & AMARAL, 2002). Dessa maneira, de acordo com os nossos resultados e de LEMOS *et al.* (2010) e FOGAÇA *et al.* (2013) podemos sugerir que de fato, o córtex PL parece ser um dos principais substratos para os efeitos emocionais e cognitivos do CBD.

Ainda, foi observado que o CBD também reduziu a atividade do CC, através da redução da expressão do Zif268. No entanto, permanece por ser investigado se o bloqueio dos receptores CB1 nessa região também irá abolir o efeito sistêmico do CBD sobre a reconsolidação.

6.9 A inibição da degradação de anandamida no córtex pré-límbico prejudica a reconsolidação da memória de medo ao contexto

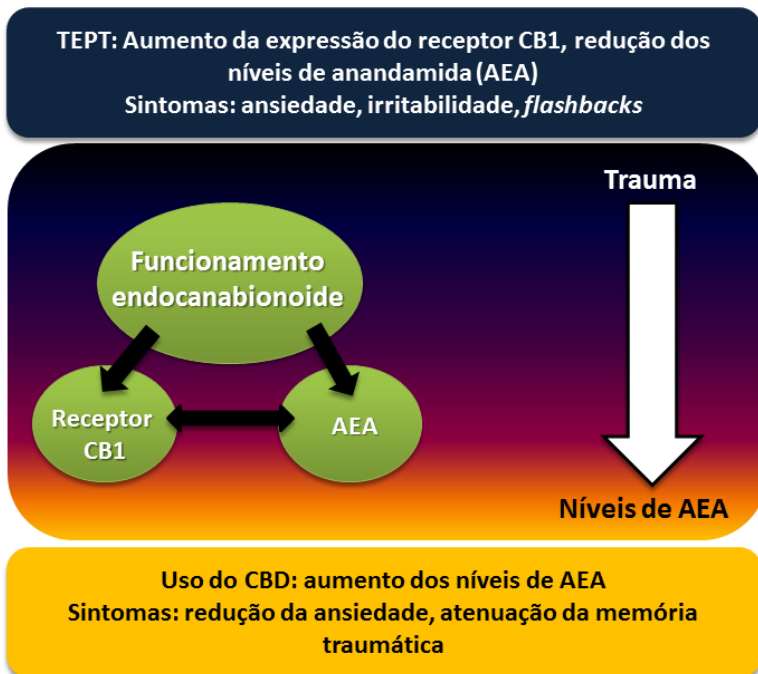
Se o efeito do CBD é de fato mediado pelo aumento da disponibilidade de AEA (BISOGNO *et al.*, 2001; LEWEKE *et al.*, 2012), pode-se esperar que o bloqueio da degradação da mesma, mas com outro inibidor produziria o mesmo efeito. Dessa maneira, foi demonstrado que o URB597, um inibidor da FAAH, quando administrado no PL produziu um efeito semelhante ao do CBD sobre a reconsolidação da memória.

Novamente, nossos dados concordam com os resultados que mostram que a AEA prejudica a reconsolidação (DE OLIVEIRA ALVAREZ *et al.*, 2008). Em memórias do tipo hedônicas, no entanto, foi visto que a administração sistêmica de URB597 potencializou a reconsolidação da memória condicionada à morfina (DE CARVALHO *et al.*, 2013). Além disso, outros efeitos do CBD, como os efeitos antipsicóticos, são dependentes da inibição da FAAH e elevação dos níveis de AEA (LEWEKE *et al.*, 2012).

A inibição da FAAH também aumenta os níveis de outras etanolamidas, como a oleoiletanolamida e a palmitoiletanolamida, as quais são estruturalmente semelhantes à AEA, mas que, no entanto, ligam-se ao receptor nuclear PPAR- α (O'SULLIVAN, 2007). Assim, não se pode descartar um efeito desses mediadores no resultado encontrado.

Esse conjunto de resultados é bastante relevante se considerarmos que pacientes com TEPT apresentam uma redução nos níveis de AEA (NEUMEISTER, 2012) e que o um aumento dos níveis desse neuromodulador no CPFm e no hipocampo de ratos reduzem os níveis de ansiedade e prejudicam a reconsolidação (LISBOA *et al.*, 2010; MCLAUGHLING *et al.*, 2012). Sabe-se que a ativação direta do receptor CB1 leva a uma rápida taquifilaxia dos mesmos (HIRVONEN *et al.*, 2012). Dessa maneira, potencializar a transmissão endocanabinoide indiretamente, elevando os níveis de AEA, seria uma estratégia que não causaria essa redução de receptores de maneira tão acentuada, pode ter uma relevância terapêutica muito maior, pois esses níveis seriam elevados em áreas sabidamente deficientes no TEPT (FANI *et al.*, 2012; PITMAN *et al.*, 2012; ADMON, MILAD & HENDLER, 2013). Neumeister (2012) propôs que talvez essa seja uma das razões pelas quais indivíduos com TEPT apresentam um aumento no consumo recreacional de *Cannabis*, já que esses pacientes relatam um alívio nos sintomas do TEPT após o uso. Dessa maneira, se pacientes com TEPT apresentam uma alta densidade de receptores CB1 e baixos níveis de AEA (fig. 26), pode-se estender essa discussão sugerindo que o alívio dos sintomas do TEPT em pacientes que utilizam maconha talvez ocorra, em parte, por uma ação de fitocanabinoides como o CBD em regiões como o córtex cingulado anterior de humanos.

Confirmando o que foi proposto por Neumeister (2013), recentemente, foi observado que indivíduos com TEPT abusam de algumas substâncias, para sentirem um alívio nos sintomas da doença (DAVIS *et al.*, 2013). Nesse contexto, permanece por ser investigado se o THC, o composto da *Cannabis* responsável pelos efeitos psicotrópicos da planta (MECHOULAM, 1986), também causa algum efeito sobre a reconsolidação, fato que poderia sugerir mais uma indicação medicinal para o uso da planta.



Adaptado de Neumeister, 2012

Figura 26: O desbalanço endocanabinoide no TEPT e o tratamento com CBD. Durante o TEPT ocorre uma redução nos níveis centrais de AEA e um aumento da expressão CB1, responsáveis em parte pelos sintomas emocionais e cognitivos da doença. O uso de um agente que potencialize indiretamente a transmissão endocanabinoide aumentaria a disponibilidade de AEA, que agiria sobre os receptores CB1 e atenuaria os sintomas do TEPT.

7. Considerações finais

A demonstração da vulnerabilidade da memória quando a mesma entra em um estado ativo reforça a ideia de que as memórias são reorganizadas em função de novas experiências, através do processo de reconsolidação. Apesar dos estudos farmacológicos mostrarem que a etapa de reconsolidação compartilha processos celulares que ocorrem na consolidação, poucos abordam os aspectos da neurobiologia da reconsolidação, limitando-se a estudar o papel do hipocampo ou da amígdala. Os resultados dos últimos dez anos de pesquisa mostraram que algumas condições devem ser cumpridas para que a reconsolidação ocorra, no entanto, ainda estamos longe de entender essa etapa do aprendizado como um todo, bem como de compreender qual a função biológica desse fenômeno.

Como diz Rakic (2009) em um de seus trabalhos, “*dado que o neocórtex cerebral é o centro de extraordinárias habilidades cognitivas, é surpreendente como poucos avanços têm sido feito nessa área*”. No presente trabalho demonstramos que uma porção do córtex pré-frontal medial, uma das regiões encefálicas mais comprometidas no TEPT (FANI *et al.*, 2012; ADMON, MILAD & HENDLER, 2013), também está envolvida com o processo de reconsolidação. Atualmente, técnicas de estimulação profunda do cérebro (do inglês: *deep brain stimulation*) tem sido testadas e usadas para o tratamento de diversos transtornos de ansiedade e de doenças neurodegenerativas, entre elas a depressão e o Parkinson (KEITEL *et al.*, 2013; HARVEY *et al.*, 2013). Com base nessas técnicas e no conhecimento da neurobiologia da reconsolidação e do TEPT, talvez esse possa ser um dos futuros tratamentos dessa patologia. Recentemente, um trabalho com humanos mostrou que o eletrochoque no momento da evocação da memória foi capaz de bloquear a reconsolidação, apagando assim, a memória aversiva que havia sido formada (KROES *et al.*, 2013).

No que tange à terapia farmacológica, também estamos longe de termos drogas seguras, eficazes e com efeitos indesejáveis leves. Nesse sentido, o sistema endocanabinoide tem aparecido como um alvo promissor, em especial o seu modulador, o CBD (BATTACHARYYA *et al.*, 2009; BERGAMASCHI *et al.*, 2011; CAMPOS *et al.*, 2012; STERN *et al.*, 2012). Apesar de esse trabalho ter contribuído para a descoberta de mais um efeito farmacológico do CBD, bem como de parte de seu mecanismo de ação, não se pode

descartar que o bloqueio da reconsolidação pelo CBD ocorra também por outros mecanismos.

Uma das teorias atuais para a formação de memórias se baseia na hipótese da marcação sináptica. Nessa hipótese, as sinapses ativadas por um evento receberiam uma marcação molecular que serviria para sequestrar proteínas estruturais, sintetizadas pelo núcleo do neurônio, permitindo alterações plásticas seletivas e sustentando as modificações necessárias para a representação daquela memória específica (FREY & MORRIS, 1997). Recentemente, foi demonstrado de maneira muito elegante, que a reconsolidação permite a formação de uma nova memória a partir do mecanismo da marcação sináptica (CASSINI *et al.*, 2013), um processo altamente dependente de cálcio. Assim, pode-se sugerir ainda, que uma droga que prejudique a reconsolidação, pode fazê-lo através da interrupção desse mecanismo de marcação sináptica.

Embora bastante promissor, vale ressaltar que esse trabalho adotou como ferramenta experimental o protocolo de condicionamento que utiliza um treino forte, mas que não é capaz de gerar generalização. Dessa maneira, o trabalho foi realizado dentro de faixas adaptativas de respostas de defesa. Como citado anteriormente, um trabalho do nosso grupo demonstra que o CBD também pode prejudicar a reconsolidação de uma memória patológica, ou seja, que sofre generalização (GAZARINI *et al.*, 2014 submetido para publicação). Confirmando a eficácia do CBD em prejudicar a reconsolidação mesmo de memórias impróprias.

Muitos trabalhos sugerem que a atividade do CPFm, incluindo o PL, está envolvido na generalização do medo (KIM *et al.*, 2013; XU & SÜDHOF, 2013; ZELIKOWSKI *et al.*, 2013). Assim, entender primeiramente qual a função da estrutura em uma faixa adaptativa auxiliará no entendimento do papel dessa região nas situações patológicas. Contribuindo para esse entendimento, tem sido observado a importância do córtex PL na generalização do medo (VANVOSSSEN, STERN & BERTOGLIO, dados não publicados).

Em conjunto, esse trabalho contribuiu para o entendimento da neurobiologia da reconsolidação, demonstrando que a atividade do córtex PL, assim como a neurotransmissão canabinoide dessa região, são importantes para essa etapa de re-estabilização da memória.

Apesar da teoria da reconsolidação hoje ser bem aceita e até parecer uma ideia simples, compreender o impacto desse fenômeno no contexto ao qual estamos inseridos, repleto de situações

estressantes que geram um grande aumento nos casos de transtornos de ansiedade como o TEPT, é algo muito mais complexo.

8. Conclusões

Os resultados encontrados nesse trabalho confirmaram a hipótese da participação do córtex PL na etapa de reconsolidação da memória, atuando como um importante substrato neural para o efeito amnésico do CBD. Dessa maneira, esse trabalho contribuiu para o entendimento tanto do processo de reconsolidação, como para o entendimento do funcionamento do CPFm nesse processo, além de ter demonstrado o efeito do CBD e seu mecanismo de ação sobre essa etapa da memória.

Como o CPFm está implicado do desenvolvimento do TEPT e de outros transtornos psiquiátricos, é de grande importância esclarecermos qual o papel dessa área na formação/manutenção de uma memória traumática. Da mesma maneira, descobrir que uma droga, cuja segurança para uso na clínica já é bem estabelecida, tem um efeito no sentido de atenuar essa memória aversiva abre uma nova oportunidade para o tratamento, que é muito limitado, dessas doenças.

9. Referências

- AZAD SC, EDER M, MARSICANO G, LUTZ B, ZIEGLGÄNSBERGER W, RAMMES G. 2003. Activation of the cannabinoid receptor type 1 decreases glutamatergic and GABAergic synaptic transmission in the lateral amygdala of the mouse. *Learn Mem.*10: 116-28.
- ADMON R, MILAD MR, HENDLER T. 2013. A causal model of post-traumatic stress disorder: disentangling predisposed from acquired neural abnormalities. *Trends Cogn Sci.* 17: 337-347.
- AGRANOFF BW, DAVIS RE, BRINK JJ. 1965. Memory fixation in the goldfish. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 54: 788-93.
- AKIRAV I, MAROUN M. 2006. Ventromedial prefrontal cortex is obligatory for consolidation and reconsolidation of object recognition memory. *Cereb Cortex.*16: 1759-65.
- ALBERINI CM. 2011. The role of reconsolidation and the dynamic process of long-term memory formation and storage. *Front Behav Neurosci.* 5:12.
- ALBERINI C, LEDOUX J. 2013. Memory reconsolidation. *Curr biol.* 23: 746-50.
- ARNSTEN AF. 2009. Stress signalling pathways that impair prefrontal cortex structure and function. *Nat Rev Neurosci.* 10: 410-22.
- ASHTON H, YOUNG AH. 2003. GABA-ergic drugs: exit stage left, enter stage right. *J Psychopharmacol.*17: 174-8.
- BAILEY CR, CORDELL E, SOBIN SM, NEUMEISTER A. 2013. Recent progress in understanding the pathophysiology of post-traumatic stress disorder: implications for targeted pharmacological treatment. *CNS Drugs.* 27: 221-32.
- BAUMGÄRTEL K, TWEEDIE-CULLEN RY, GROSSMANN J, GEHRIG P, LIVINGSTONE-ZATCHEJ M, MANSUY IM. 2009. Changes in the proteome after neuronal zif268 overexpression. *J Proteome Res.* 8: 3298-316.
- BHATTACHARYYA S, FUSAR-POLI P, BORGWARDT S, MARTIN-SANTOS R, NOSARTI C, O'CARROLL C, ALLEN P, SEAL

- ML, FLETCHER PC, CRIPPA JA, GIAMPIETRO V, MECHELLI A, ATAKAN Z, MCGUIRE P. 2009. Modulation of mediotemporal and ventrostriatal function in humans by Delta9-tetrahydrocannabinol: a neural basis for the effects of Cannabis sativa on learning and psychosis. *Arch Gen Psychiatry* 66: 442–451.
- BERGAMASCHI MM, QUEIROZ RH, ZUARDI AW, CRIPPA JA. 2011. Safety and side effects of cannabidiol, a Cannabis sativa constituent. *Curr Drug Saf.* 6: 237-49.
- BESNARD A, CABOCHE J, LAROCHE S. 2012. Reconsolidation of memory: a decade of debate. *Prog Neurobiol.* 99:61-80.
- BIANCHI L. 1895. The functions of the frontal lobes. *Brain* 18 , 497 – 530.
- BIANCHI L. 1922. *The Mechanism of the Brain and the Function of the Frontal Lobes.* Edinburgh: Livingstone.
- BISOGNO T, HANUS L, DE PETROCELLIS L, TCHILIBON S, PONDE DE, BRANDI I, MORIELLO AS, DAVIS JB, MECHOULAM R, DI MARZO V. 2001. Molecular targets for cannabidiol and its synthetic analogues: effect on vanilloid VR1 receptors and on the cellular uptake and enzymatic hydrolysis of anandamide. *Br J Pharmacol.* 134: 845-52.
- BITENCOURT RM, PAMPLONA FA, TAKAHASHI RN. 2008. Facilitation of contextual fear memory extinction and anti-anxiogenic effects of AM404 and cannabidiol in conditioned rats. *Eur Neuropsychopharmacol.* 18: 849-59.
- BLISS TV, COLLINGRIDGE GL. 1993. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature.* 361: 31-39.
- BOUTON ME, WESTBROOK RF, CORCORAN KA, MAREN S. 2006. Contextual and temporal modulation of extinction: behavioral and biological mechanisms. *Biol Psychiatry.* 60:352-360.
- BOUCHER AA, VIVIER L, METNA-LAURENT M, BRAYDA-BRUNO L, MONS N, ARNOLD JC, MICHEAU J. 2009. Chronic treatment with Delta(9)-tetrahydrocannabinol impairs spatial memory and reduces zif268 expression in the mouse forebrain. *Behav Pharmacol.* 20: 45-55.

- BOZON B, DAVIS S, LAROCHE S. 2003. A requirement for the immediate early gene *zif268* in reconsolidation of recognition memory after retrieval. *Neuron*. 40: 695-701.
- BUCHERELLI C, BALDI E, MARIOTTINI C, PASSANIMB, BLANDINA P. 2006. Aversive memory reactivation engages in the amygdala only some neurotransmitters involved in consolidation. *Learn Mem* 13:426–430.
- BURGOS-ROBLES A, VIDAL-GONZALEZ I, QUIRK GJ. 2009. Sustained conditioned responses in prelimbic prefrontal neurons are correlated with fear expression and extinction failure. *J Neurosci*. 29:8474-82.
- BUSTOS SG, MALDONADO H, MOLINA VA. 2009. Disruptive effect of midazolam on fear memory reconsolidation: decisive influence of reactivation time span and memory age. *Neuropsychopharmacology* 34: 446-457.
- BUSTOS SG, MALDONADO H, MOLINA VA. 2006. Midazolam disrupts fear memory reconsolidation. *Neuroscience*. 139:831-42.
- BUSTOS SG, GIACHERO M, MALDONADO H, MOLINA VA. 2010. Previous stress attenuates the susceptibility to Midazolam's disruptive effect on fear memory reconsolidation: influence of pre-reactivation D-cycloserine administration. *Neuropsychopharmacology*. 35: 1097-108.
- CAMPOS AC, GUIMARÃES FS. 2008. Involvement of 5HT1A receptors in the anxiolytic-like effects of cannabidiol injected into the dorsolateral periaqueductal gray of rats. *Psychopharmacology (Berl)*. 199: 223-30.
- CAMPOS AC, MOREIRA FA, GOMES FV, DEL BEL EA, GUIMARÃES FS. 2012. Multiple mechanisms involved in the large-spectrum therapeutic potential of cannabidiol in psychiatric disorders. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 367:3364-78.
- CARLINI EA, LEITE JR, TANNHAUSER M, BERARDI AC. 1973 Letter: Cannabidiol and Cannabis sativa extract protect mice and rats against convulsive agents. *J Pharm Pharmacol*. 25: 664-5.
- CASAROTTO PC, GOMES FV, RESSTEL LB, GUIMARÃES FS. 2010. Cannabidiol inhibitory effect on marble-burying behaviour: involvement of CB1 receptors. *Behav Pharmacol*. 21: 353-8.

- CASSINI LF, SIERRA RO, HAUBRICH J, CRESTANI AP, SANTANA F, DE OLIVEIRA ALVARES L, QUILLFELDT JA. 2013. Memory reconsolidation allows the consolidation of a concomitant weak learning through a synaptic tagging and capture mechanism. *Hippocampus*. No prelo.
- CHAPMAN NR, PERKINS ND. 2000. Inhibition of the RelA (p65) NF-kappaB subunit by Egr-1. *J Biol Chem*. 275: 4719-25.
- CHOI DC, GOURLEY SL, RESSLER KJ. 2012. Prelimbic BDNF and TrkB signaling regulates consolidation of both appetitive and aversive emotional learning. *Transl Psychiatry*. 2: e205.
- COLLEY PA, SHEU FS, ROUTTENBERG A. 1990. Inhibition of protein kinase C blocks two components of LTP persistence, leaving initial potentiation intact. *J Neurosci*. 10: 3353-60.
- CONDORELLI DF, DELL'ALBANI P, AMICO C, LUKASIUK K, KACZMAREK L, GIUFFRIDA-STELLA AM. 1994. Glutamate receptor-driven activation of transcription factors in primary neuronal cultures. *Neurochem Res*. 19: 489-99.
- CORCORAN KA, QUIRK GJ. 2007. Activity in prefrontal cortex is necessary for the expression of learned, but not innate, fears. *J Neurosci*. 27:840-844.
- CRIPPA JA, ZUARDI AW, GARRIDO GE, WICHERT-ANA L, GUARNIERI R, FERRARI L, AZEVEDO-MARQUES PM, HALLAK JE, MCGUIRE PK, FILHO BUSATTO G. 2004. Effects of cannabidiol (CBD) on regional cerebral blood flow. *Neuropsychopharmacology*. 29: 417-26.
- DA SILVA WC, CARDOSO G, BONINI JS, BENETTI F, IZQUIERDO I. 2013. Memory reconsolidation and its maintenance depend on L-voltage-dependent calcium channels and CaMKII functions regulating protein turnover in the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 110: 6566-70.
- DAS RK, KAMBOJ SK, RAMADAS M, YOGAN K, GUPTA V, REDMAN E, CURRAN HV, MORGAN CJ. 2013. Cannabidiol enhances consolidation of explicit fear extinction in humans. *Psychopharmacology (Berl)*. 226:781-92.

- DAVIS M. 2000. The role of the amygdala in conditioned and unconditioned fear and anxiety. Em: *The Amygdala: A Functional Analysis*, editora Oxford, UK: Oxford Univ., 213–287.
- DAVIS S, BOZON B, LAROCHE S. 2003. How necessary is the activation of the immediate early gene zif268 in synaptic plasticity and learning? *Behav Brain Res.*142: 17-30.
- DAVIS TA, JOVANOVIĆ T, NORRHOLM SD, GLOVER EM, SWANSON M, SPANN S, BRADLEY B.2013. Substance Use Attenuates Physiological Responses Associated With PTSD among Individuals with Co-Morbid PTSD and SUDs. *J Psychol Psychother. Suppl* 7.
- DEBIEC J, LEDOUX JE, NADER K. 2002. Cellular and systems reconsolidation in the hippocampus. *Neuron* 36: 527-538.
- DEBIEC J, DOYÈRE V, NADER K, LEDOUX JE. 2006. Directly reactivated, but not indirectly reactivated, memories undergo reconsolidation in the amygdala. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 3428-3433.
- DE CARVALHO CR, PAMPLONA FA, CRUZ JS, TAKAHASHI RN. 2013. Endocannabinoids underlie reconsolidation of hedonic memories in Wistar rats. *Psychopharmacology (Berl)*. No prelo.
- DE LA FUENTE V, FREUDENTHAL R, ROMANO A. 2011. Reconsolidation or extinction: transcription factor switch in the determination of memory course after retrieval. *J Neurosci.*31: 5562-73.
- DE OLIVEIRA ALVARES L, PASQUALINI GENRO B, DIEHL F, MOLINA VA, QUILLFELDT JA. 2008. Opposite action of hippocampal CB1 receptors in memory reconsolidation and extinction. *Neuroscience.*154: 1648-55.
- DE OLIVEIRA ALVARES L, CRESTANI AP, CASSINI LF, HAUBRICH J, SANTANA F, QUILLFELDT JA. 2013. Reactivation enables memory updating, precision-keeping and strengthening: exploring the possible biological roles of reconsolidation. *Neuroscience.* 244:42-8.
- DESJARDINS S, MAYO W, VALLÉE M, HANCOCK D, LE MOAL M, SIMON H, ABROUS DN.1997. Effect of aging on the basal

expression of c-Fos, c-Jun, and Egr-1 proteins in the hippocampus. *Neurobiol Aging*. 18: 37-44.

DEVANE WA, DYSARZ FA 3RD, JOHNSON MR, MELVIN LS, HOWLETT AC. 1988. Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Mol Pharmacol*. 34: 605-13.

DEVANE WA, HANUS L, BREUER A, PERTWEE RG, STEVENSON LA, GRIFFIN G, GIBSON D, MANDELBAUM A, ETINGER A, MECHOULAM R. 1992. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science*. 258: 1946-9.

DI MARZO V, FONTANA A, CADAS H, SCHINELLI S, CIMINO G, SCHWARTZ JC, PIOMELLI D. 1994. Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. *Nature*. 372:686-91.

DI MARZO V, FONTANA A. 1995. Anandamide, an endogenous cannabinomimetic eicosanoid: 'killing two birds with one stone'. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 53:1-11.

DI MARZO V, DE PETROCELLIS L. 2012. Why do cannabinoid receptors have more than one endogenous ligand? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 367: 3216-28.

DO MONTE FH, SOUZA RR, BITENCOURT RM, KROON JA, TAKAHASHI RN. 2013. Infusion of cannabidiol into infralimbic cortex facilitates fear extinction via CB1 receptors. *Behav Brain Res*. 250:23-7.

DUDAI Y. 2004. The neurobiology of consolidation, or, how stable is the engram? *Annu Rev Psychol*. 55:51-86.

DUDAI Y. 2006. Reconsolidation: the advantage of being refocused. *Curr Opin Neurobiol*. 16: 174-8.

DUDAI Y. 2012. The restless engram: consolidations never end. *Annu Rev Neurosci*. 35: 227-47.

DUVARCI S, NADER K. 2004. Characterization of fear memory reconsolidation. *J Neurosci* 24: 9269-9275.

- DUVARCI S, NADER K, LEDOUX JE. 2005. Activation of extracellular signal-regulated kinase- mitogen-activated protein kinase cascade in the amygdala is required for memory reconsolidation of auditory fear conditioning. *Eur J Neurosci.* 21: 283-9.
- EINARSSON EÖ, NADER K. 2012. Involvement of the anterior cingulate cortex in formation, consolidation, and reconsolidation of recent and remote contextual fear memory. *Learn Mem.* 19:449-52.
- EISENBERG M, KOBILO T, BERMAN DE, DUDAI Y. 2003. Stability of retrieved memory: inverse correlation with trace dominance. *Science.* 301: 1102-4.
- ETKIN A, EGNER T, KALISCH R. 2011. Emotional processing in anterior cingulate and medial prefrontal cortex. *Trends Cogn Sci.*15: 85-93.
- FANG Q, LI FQ, LI YQ, XUE YX, HE YY, LIU JF, LU L, WANG JS. 2011. Cannabinoid CB1 receptor antagonist rimonabant disrupts nicotine reward associated memory in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 99: 738–742.
- FANI N, JOVANOVIĆ T, ELY TD, BRADLEY B, GUTMAN D, TONE EB, RESSLER KJ. 2012. Neural correlates of attention bias to threat in post-traumatic stress disorder. *Biol Psychol.* 90:134-142.
- FANSELOW MS. 2010. From contextual fear to a dynamic view of memory systems. *Trends Cogn Sci.* 14: 7-15.
- FANSELOW MS, PONNUSAMY R. 2008. The use of conditioning tasks to model fear and anxiety em: *Handbook of anxiety and fear.* Editora: Elsevier. 17: 46 – 65.
- FERRIER D. 1886. *Functions of the Brain.* Londres: Smith and Elder.
- FLEXNER LB, FLEXNER JB, ROBERTS RB. 1967. Memory in mice analyzed with antibiotics. Antibiotics are useful to study stages of memory and to indicate molecular events which sustain memory. *Science*, 155: 1377-1383.
- FOGAÇA MV, REIS FM, CAMPOS AC, GUIMARÃES FS. 2013. Effects of intra-prelimbic prefrontal cortex injection of cannabidiol on anxiety-like behavior: Involvement of 5HT1A receptors and previous stressful experience. *Eur Neuropsychopharmacol.* No prelo.

- FRANKLAND PW, BONTEMPI B, TALTON LE, KACZMAREK L, SILVA AJ. 2004. The involvement of the anteriorcingulate cortex in remote contextual fear memory. *Science*. 304: 881-3.
- FREY U, MORRIS RG. 1997. Synaptic tagging and long-term potentiation. *Nature*. 385: 533-6.
- FREY U, KRUG M, REYMANN KG, MATTHIES H. 1988. Anisomycin, an inhibitor of protein synthesis, blocks late phases of LTP phenomena in the hippocampal CA1 region in vitro. *Brain Res*. 452: 57-65.
- FUSAR-POLI P, CRIPPA JA, BHATTACHARYYA S, BORGWARDT SJ, ALLEN P, MARTIN-SANTOS R, SEAL M, SURGULADZE SA, O'CARROL C, ATAKAN Z, ZUARDI AW, MCGUIRE PK. 2009. Distinct effects of {delta}9-tetrahydrocannabinol and cannabidiol on neural activation during emotional processing. *Arch Gen Psychiatry*. 66: 95-105.
- FUSTER JM. 2008. The prefrontal cortex. Londres: Elsevier.
- GAFFORD GM, PARSONS RG, HELMSTETTER FJ. 2011. Consolidation and reconsolidation of contextual fear memory requires mammalian target of rapamycin-dependent translation in the dorsal hippocampus. *Neuroscience*. 182: 98-104.
- GAMACHE K, PITMAN RK, NADER K. 2012. Preclinical evaluation of reconsolidation blockade by clonidine as a potential novel treatment for posttraumatic stress disorder. *Neuropsychopharmacology*. 37: 2789-96.
- GAONI Y, MECHOULAM R. 1964. Isolation, structure and partial synthesis of an active constituent of hashish. *J. Am. Chem. Soc*. 86: 1646-1964.
- GAZARINI L, STERN CA, CAROBREZ AP, BERTOGLIO LJ. 2013. Enhanced noradrenergic activity potentiates fear memory consolidation and reconsolidation by differentially recruiting α 1- and β -adrenergic receptors. *Learn Mem*. 20: 210-9.
- GAZARINI L, STERN CA, BERTOGLIO LJ. 2014. Evidence for effectiveness of a dual step pharmacological intervention to mitigate a PTSD-like memory. Submetido para publicação.

GHOSH A, GINTY DD, BADING H, GREENBERG ME. 1994.

Calcium regulation of gene expression in neuronal cells. *J Neurobiol.* 25: 294-303.

GIACHERO M. Interacción entre un evento traumático y las fases de

procesamiento de una memoria emocional: modulación farmacológica.

2013. 117f. Tese (Doutorado em Ciências Químicas) - Departamento de Farmacologia, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina, 2013.

GIACHERO M, BUSTOS SG, CALFA G, MOLINA VA. 2013. A BDNF

sensitive mechanism is involved in the fear memory resulting from the interaction between stress and the retrieval of an established trace. *Learn Mem.* 20: 245-55.

GOLDMAN-RAKIC PS. 1987. Development of cortical circuitry and

cognitive function. *Child Dev.* 58:601-22.

GOMES FV, RESSTEL LB, GUIMARÃES FS. 2011. The anxiolytic-like

effects of cannabidiol injected into the bed nucleus of the stria terminalis are mediated by 5-HT1A receptors. *Psychopharmacology*

(Berl). 213:465-73.

GOMES FV, REIS DG, ALVES FH, CORRÊA FM, GUIMARÃES

FS, RESSTEL LB. 2012. Cannabidiol injected into the bed nucleus of the stria terminalis reduces the expression of contextual fear conditioning via 5-HT1A receptors. *J Psychopharmacol.* 26: 104-13.

GONZALEZ C, KRAMAR C, GARAGOLI F, ROSSATO JI,

WEISSTAUB N, CAMMAROTA M, MEDINA JH. 2013. Medial

prefrontal cortex is a crucial node of a rapid learning system that retrieves recent and remote memories. *Neurobiol Learn Mem.* 103:19-25.

GOSHEN I, BRODSKY M, PRAKASH R, WALLACE J, GRADINARU

V, RAMAKRISHNAN C, DEISSEROTH K. 2011. Dynamics of retrieval strategies for remote memories. *Cell.* 147: 678-89.

GUIMARÃES FS, CHIARETTI TM, GRAEFF FG, ZUARDI AW. 1990.

Antianxiety effect of cannabidiol in the elevated plus-maze.

Psychopharmacology (Berl). 100: 558-9.

HALL J, THOMAS KL, EVERITT BJ. 2001. Cellular imaging of zif268

expression in the hippocampus and amygdala during contextual and

cued fear memory retrieval: selective activation of hippocampal CA1 neurons during the recall of contextual memories. *J Neurosci.* 21: 2186-2193.

HARDT O, EINARSSON EO, NADER K. 2010. A bridge over troubled water: reconsolidation as a link between cognitive and neuroscientific memory research traditions. *Annu Rev Psychol.* 61: 141-67.

HART G, HARRIS JA, WESTBROOK RF. 2009. Systemic or intra-amygdala injection of a benzodiazepine (midazolam) impairs extinction but spares re-extinction of conditioned fear responses. *Learn Mem.* 16: 53-61.

HARVEY PO, VAN DEN EYNDE F, ZANGEN A, BERLIM MT. 2013. Neural correlates of clinical improvement after deep transcranial magnetic stimulation (DTMS) for treatment-resistant depression: a case report using functional magnetic resonance imaging. *Neurocase.* No prelo.

HEBB DO. 1949. *The Organization of Behavior.* Nova Iorque: Wiley.

HEIDBREDER CA, GROENEWEGEN HJ. 2003. The medial prefrontal cortex in the rat: evidence for a dorso-ventral distinction based upon functional and anatomical characteristics. *Neurosci Biobeh Rev.* 27:555-79.

HERDEGEN T, LEAH JD. 1998. Inducible and constitutive transcription factors in the mammalian nervous system: control of gene expression by Jun, Fos and Krox, and CREB/ATF proteins. *Brain Res Rev.* 28: 370-490.

HERKENHAM M, LYNN AB, LITTLE MD, JOHNSON MR, MELVIN LS, DE COSTA BR, RICE KC. 1990. Cannabinoid receptor localization in brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 1932-1936.

HERRINGA RJ, PHILLIPS ML, FOURNIER JC, KRONHAUS DM, GERMAIN A. 2013. Childhood and adult trauma both correlate with dorsal anterior cingulate activation to threat in combat veterans. *Psychol Med.* 7:1533-42.

HILL MN, MCLAUGHLIN RJ, PAN B, FITZGERALD ML, ROBERTS CJ, LEE TT, KARATSOREOS IN, MACKIE K, VIAU V, PICKEL VM, MCEWEN BS, LIU QS, GORZALKA BB, HILLARD CJ. 2011.

Recruitment of prefrontal cortical endocannabinoid signaling by glucocorticoids contributes to termination of the stress response. *J Neurosci.* 31: 10506-15.

HILL MN, BIERER LM, MAKOTKINE I, GOLIER JA, GALEA S, MCEWEN BS, HILLARD CJ, YEHUDA R. 2013. Reductions in circulating endocannabinoid levels in individuals with post-traumatic stress disorder following exposure to the world trade center attacks. *Psychoneuroendocrinology.* 38:2952-61.

HIRVONEN J, GOODWIN RS, LI CT, TERRY GE, ZOGHBI SS, MORSE C, PIKE VW, VOLKOW ND, HUESTIS MA, INNIS RB. 2011. Reversible and regionally selective down regulation of brain cannabinoid CB1 receptors in chronic daily cannabis smokers. *Mol Psychiatry.* 17: 642-9.

HITZIG , E. 1874. Untersuchungen über das Gehirn. Berlin: Hirschwald .

HOOVER WB, VERTES RP. 2007. Anatomical analysis of afferent projections to the medial prefrontal cortex in the rat. *Brain Struct Funct.* 212:149-79.

HOWLETT AC, BARTH F, BONNER TI, CABRAL G, CASELLAS P, DEVANE WA, FELDER CC, HERKENHAM M, MACKIE K, MARTIN BR, MECHOULAM R, PERTWEE RG. 2002. International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacol Rev.* 54:161-202.

HUGHES KC, SHIN LM. 2011. Functional neuroimaging studies of post-traumatic stress disorder. *Expert Rev Neurother.* 11: 275-85.

IZQUIERDO I, ORSINGHER OA, BERARDI AC. 1973. Effect of cannabidiol and of other cannabis sativa compounds on hippocampal seizure discharges. *Psychopharmacology.* 28: 95-102.

IZQUIERDO I, MEDINA JH. 1995. Correlation between the pharmacology of long-term potentiation and the pharmacology of memory. *Neurobiol Learn Mem.* 63: 19-32.

IZQUIERDO I, MEDINA JH, VIANNA MR, IZQUIERDO LA, BARROS DM. 1999. Separate mechanisms for short- and long-term memory. *Behav Brain Res,* 103: 1-11.

- IZZO AA, BORRELLI F, CAPASSO R, DI MARZO V, MECHOULAM R. 2009. Non-psychotropic plant cannabinoids: new therapeutic opportunities from an ancient herb. *Trends Pharmacol Sci.* 30: 515-27.
- JACOB W, MARSCH R, MARSICANO G, LUTZ B, WOTJAK CT. 2012. Cannabinoid CB1 receptor deficiency increases contextual fear memory under highly aversive conditions and long-term potentiation in vivo. *Neurobiol Learn Mem.* 98: 47-55.
- JOBIM PF, PEDROSO TR, CHRISTOFF RR, WERENICZ A, MAURMANN N, REOLON GK, ROESLER R. 2012. Inhibition of mTOR by rapamycin in the amygdala or hippocampus impairs formation and reconsolidation of inhibitory avoidance memory. *Neurobiol Learn Mem.* 97: 105-12.
- JOVANOVIC T, NORRHOLM SD, FENNELL JE, KEYES M, FIALLOS AM, MYERS KM, DAVIS M, DUNCAN EJ. 2009. Posttraumatic stress disorder may be associated with impaired fear inhibition: relation to symptom severity. *Psychiatry Res.* 167: 151-60.
- KAANG BK, LEE SH, KIM H. 2009. Synaptic protein degradation as a mechanism in memory reorganization. *Neuroscientist.* 15: 430-5.
- KACZMAREK L, CHAUDHURI A. 1997. Sensory regulation of immediate-early gene expression in mammalian visual cortex: implications for functional mapping and neural plasticity. *Brain Res Rev.* 23: 237-56.
- KATZ JJ, HALSTEAD WC. 1950. Protein organization and mental function. *Comp Psychol Monogr.* 20: 1-38.
- KEITEL A, WOJTECKI L, HIRSCHMANN J, HARTMANN CJ, FERREA S, SÜDMEYER M, SCHNITZLER A. 2013. Motor and cognitive placebo-/nocebo-responses in Parkinson's disease patients with deep brain stimulation. *Behav Brain Res.* 250:199-205.
- KENTROS CG, AGNIHOTRI NT, STREATER S, HAWKINS RD, KANDEL ER. 2004. Increased attention to spatial context increases both place field stability and spatial memory. *Neuron.* 42, 283–295.
- KIM EJ, KIM N, KIM HT, CHOI JS. 2013. The prelimbic cortex is critical for context-dependent fear expression. *Front Behav Neurosci.* 7:73.

- KIM JJ, FANSELOW MS. 1992. Modality-specific retrograde amnesia of fear. *Science*. 256: 675-7.
- KIM J, KWON JT, KIM HS, JOSSELYN SA, HAN JH. 2014. Memory recall and modifications by activating neurons with elevated CREB. *Nat Neurosci*. 17:65-72.
- KLAVIR O, GENUUD-GABAI R, PAZ R. 2012. Low-frequency stimulation depresses the primate anterior-cingulate-cortex and prevents spontaneous recovery of aversive memories. *J Neurosci*. 32: 8589-8597.
- KOBILO T, HAZVI S, DUDAI Y. 2007. Role of cortical cannabinoid CB1 receptor in conditioned taste aversion memory. *Eur J Neurosci*. 25: 3417-21.
- KOWAL MA, HAZEKAMP A, COLZATO LS, VAN STEENBERGEN H, HOMMEL B. 2013. Modulation of cognitive and emotional processing by cannabidiol: the role of the anterior cingulate cortex. *Front Hum Neurosci*. 7:147.
- KROES MC, TENDOLKAR I, VAN WINGEN GA, VAN WAARDE JA, STRANGE BA, FERNÁNDEZ G. 2013. An electroconvulsive therapy procedure impairs reconsolidation of episodic memories in humans. *Nat Neurosci*. No prelo.
- KUCEWICZ MT, TRICKLEBANK MD, BOGACZ R, JONES MW. 2011. Dysfunctional prefrontal cortical network activity and interactions following cannabinoid receptor activation. *J Neurosci*. 31: 15560-8.
- LATTAL KM, ABEL T. 2004. Behavioral impairments caused by injections of the protein synthesis inhibitor anisomycin after contextual retrieval reverse with time. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101:4667-72.
- LAZENKA MF, SELLEY DE, SIM-SELLEY LJ. 2013. Brain regional differences in CB1 receptor adaptation and regulation of transcription. *Life Sci*. 92: 446-52.
- LEDGERWOOD CJ, GREENWOOD SM, BRETT RR, PRATT JA, BUSHELL TJ. 2011. Cannabidiol inhibits synaptic transmission in rat hippocampal cultures and slices via multiple receptor pathways. *Br J Pharmacol*. 162: 286-94.

- LEDOUX JE. 2000. Emotion circuits in the brain. *Annu Rev Neurosci.* 23: 155–184.
- LEE JL. 2008. Memory reconsolidation mediates the strengthening of memories by additional learning. *Nat Neurosci.* 11: 1264-6.
- LEE JL. 2010. Memory reconsolidation mediates the updating of hippocampal memory content. *Front Behav Neurosci.* 4:168.
- LEE JL, EVERITT BJ, THOMAS KL. 2004. Independent cellular processes for hippocampal memory consolidation and reconsolidation. *Science.* 304:839-843.
- LEMOIS JI, RESSEL LB, GUIMARÃES FS. 2010. Involvement of the prelimbic prefrontal cortex on cannabidiol-induced attenuation of contextual conditioned fear in rats. *Behav Brain Res.* 207:105-11.
- LEWEKE FM, PIOMELLI D, PAHLISCH F, MUHL D, GERTH CW, HOYER C, KLOSTERKÖTTER J, HELLMICH M, KOETHE D. 2012. Cannabidiol enhances anandamide signaling and alleviates psychotic symptoms of schizophrenia. *Transl Psychiatry.* 2: e94.
- LI HL. 1973. An archeological and historical account of cannabis in China. *Economic Botany.* 28: 437-448.
- LI Y, MELONI EG, CARLEZON WA JR, MILAD MR, PITMAN RK, NADER K, BOLSHAKOV VY. 2013. Learning and reconsolidation implicate different synaptic mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 110: 4798-803.
- LIM EP, TAN CH, JAY TM, DAWE GS. 2010. Locus coeruleus stimulation and noradrenergic modulation of hippocampo-prefrontal cortex long-term potentiation. *Int J Neuropsychopharmacol.* 13:1219-31.
- LIN HC, MAO SC, GEAN PW. 2006. Effects of intra-amygdala infusion of CB1 receptor agonists on the reconsolidation of fear-potentiated startle. *Learn Mem.* 13: 316-21.
- LISBOA SF, REIS DG, DA SILVA AL, CORRÊA FM, GUIMARÃES FS, RESSEL LB. 2010. Cannabinoid CB1 receptors in the medial prefrontal cortex modulate the expression of contextual fear conditioning. *Int J Neuropsychopharmacol.* 13: 1163-73.

- LISBOA SF, STECCHINI MF, CORRÊA FM, GUIMARÃES FS, RESSEL LB. 2010. Different role of the ventral medial prefrontal cortex on modulation of innate and associative learned fear. *Neuroscience*. 171: 760-8.
- LOMBER SG. 1999. The advantages and limitations of permanent or reversible deactivation techniques in the assessment of neural function. *J Neurosci Methods*. 86: 109-17.
- LONERGAN MH, OLIVERA-FIGUEROA LA, PITMAN RK, BRUNET A. 2013. Propranolol's effects on the consolidation and reconsolidation of long-term emotional memory in healthy participants: a meta-analysis. *J Psychiatry Neurosci*. 38: 222-31.
- LYOO IK, KIM JE, YOON SJ, HWANG J, BAE S, KIM DJ. 2011. The neurobiological role of the dorsolateral prefrontal cortex in recovery from trauma. Longitudinal brain imaging study among survivors of the South Korean subway disaster. *Arch Gen Psychiatry*. 68: 701-13.
- MACTUTUS CF, RICCIO DC, FERREK JM. 1979. Retrograde amnesia for old (reactivated) memory: some anomalous characteristics. *Science*. 204:1319-20.
- MACKIE K. 2005. Distribution of cannabinoid receptors in the central and peripheral nervous system. In: *Handbook of experimental pharmacology*. 168: 299–325. Berlin, Germany: Springer.
- MAMIYA N, FUKUSHIMA H, SUZUKI A, MATSUYAMA Z, HOMMA S, FRANKLAND PW, KIDA S. 2009. Brain region-specific gene expression activation required for reconsolidation and extinction of contextual fear memory. *J Neurosci*. 29: 402-13.
- MARSICANO G, LUTZ B. 1999. Expression of the cannabinoid receptor CB1 in distinct neuronal subpopulations in the adult mouse forebrain. *Eur J Neurosci*. 11: 4213-25.
- MARTIN JH. 1991. Autoradiographic estimation of the extent of reversible inactivation produced by microinjection of lidocaine and muscimol in the rat. *Neuroscience Letters*. 127:160-164.
- MCLAUGHLIN RJ, HILL MN, BAMBICO FR, STUHR KL, GOBBI G, HILLARD CJ, GORZALKA BB. 2012. Prefrontal cortical

- anandamide signaling coordinates coping responses to stress through a serotonergic pathway. *Eur Neuropsychopharmacol.* 22: 664-71.
- MAREN S. 2011. Seeking a spotless mind: extinction, deconsolidation, and erasure of fear memory. *Neuron.* 70: 830-45.
- MAROUN M, AKIRAV I. 2009. Differential involvement of dopamine D1 receptor and MEK signaling pathway in the ventromedial prefrontal cortex in consolidation and reconsolidation of recognition memory. *Learn Mem.* 16: 243-7.
- MAVIEL T, DURKIN TP, MENZAGHI F, BONTEMPI B. 2004. Sites of neocortical reorganization critical for remote spatial memory. *Science.* 305: 96-9.
- MECHOULAM R. 1986. Interview with Prof. Raphael Mechoulam, codiscoverer of THC. Interview by Stanley Einstein. *Int J Addict.* 21: 579-87.
- MECHOULAM R, HANUS L. 2000. A historical overview of chemical research on cannabinoids. *Chem Phys Lipids.* 108: 1-13.
- MECHOULAM R, PARKER LA, GALLILY R. 2002. Cannabidiol: an overview of some pharmacological aspects. *J Clin Pharmacol.* 42: 11S-19S.
- MCDONALD AJ. 1998. Cortical pathways to the mammalian amygdala. *Prog Neurobiol.* 55:257-332.
- MCGAUGH JL. 2000. Memory--a century of consolidation. *Science.* 287:248-51.
- MILEKIC MH, ALBERINI CM. 2002. Temporally graded requirement for protein synthesis following memory reactivation. *Neuron.* 36: 521-5.
- MILLER CA, MARSHALL JF. 2004. Altered prelimbic cortex output during cue-elicited drug seeking. *J Neurosci.* 24:6889-97
- MISANIN JR, MILLER RR, LEWIS DJ. 1968. Retrograde amnesia produced by electroconvulsive shock after reactivation of a consolidated memory trace. *Science.* 160: 554-5.

- MOCHNY CR, KINCHESKI GC, MOLINA VA, CAROBREZ AP. 2013. Dorsolateral periaqueductal gray stimulation prior to retrieval potentiates a contextual fear memory in rats. *Behav Brain Res.* 237: 76-81
- MOREIRA FA, AGUIAR DC, GUIMARÃES FS. 2006. Anxiolytic-like effect of cannabidiol in the rat Vogel conflict test. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.*30: 1466-71.
- MORGAN CJ, DAS RK, JOYE A, CURRAN HV, KAMBOJ SK. 2013. Cannabidiol reduces cigarette consumption in tobacco smokers: preliminary findings. *Addict Behav.*38: 2433-6.
- MOUNTCASTLE VB.1995. The parietal system and some higher brain functions. *Cereb Cortex.* 5: 377-90.
- MÜLLER GE.; PILZECKER A. 1900. Experimentelle Beiträge zur Lehre vom Gedächtnis. *Z. Psychol. Ergänzungsband* 1: 1–300.
- MUNRO S, THOMAS KL, ABU-SHAAR M. 1993.Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature.* 365: 61-5.
- MURAVIEVA EV, ALBERINI CM. 2010. Limited efficacy of propranolol on the reconsolidation of fear memories. *Learn Mem.*17: 306-13.
- MYERS KM, DAVIS M. 2002. Behavioral and neural analysis of extinction. *Neuron.* 36:567-84.
- NADER K. 2004. Neuroscience: re-recording human memories. *Nature.*427: 598.
- NADER K, SCHAFE GE, LEDOUX JE. 2000. The labile nature of consolidation theory. *Nat Rev Neurosci.* 1:216-9.
- NADER K, HARDT O. 2009. A single standard for memory: the case for reconsolidation. *Nat Rev Neurosci.* 10: 224-34.
- NEUMEISTER A. 2013. The endocannabinoid system provides an avenue for evidence-based treatment development for PTSD. *Depress Anxiety.* 30: 93-6.

- NEVES G, COOKE SF, BLISS TV. 2008. Synaptic plasticity, memory and the hippocampus: a neural network approach to causality. *Nat Rev Neurosci.* 9: 65-75.
- NORTHCUTT RG. 1981. Evolution of the telencephalon in non-mammals. *Ann. Rev. Neurosci.* 4, 301–350.
- OGREN SO, ERIKSSON TM, ELVANDER-TOTTIE E, D'ADDARIO C, EKSTRÖM JC, SVENNINGSSON P. 2008. The role of 5-HT(1A) receptors in learning and memory. *Behav Brain Res* 195: 54-77.
- ONAIWI ES, ISHIGURO H, GONG JP, PATEL S, PERCHUK A, MEOZZI PA, MYERS L, MORA Z, TAGLIAFERRO P, GARDNER E, BRUSCO A, AKINSHOLA BE, LIU QR, HOPE B, IWASAKI S, ARINAMI T, TEASENFITZ L, UHL GR. 2006. Discovery of the presence and functional expression of cannabinoid CB2 receptors in brain. *Ann N Y Acad Sci.* 1074:514-36.
- OTIS JM, DASHEW KB, MUELLER D. 2013. Neurobiological dissociation of retrieval and reconsolidation of cocaine-associated memory. *J Neurosci.* 33: 1271-81a.
- PAMPLONA FA, TAKAHASHI RN. 2006. WIN 55212-2 impairs contextual fear conditioning through the activation of CB1 cannabinoid receptors. *Neurosci Lett.* 397: 88-92.
- PAMPLONA FA, PREDIGER RD, PANDOLFO P, TAKAHASHI RN. 2006. The cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2 facilitates the extinction of contextual fear memory and spatial memory in rats. *Psychopharmacology (Berl)*. 188: 641-9.
- PAPE HC, PARE D. 2010. Plastic synaptic networks of the amygdala for the acquisition, expression, and extinction of conditioned fear. *Physiol Rev.* 90: 419-63.
- PARSONS RG, GAFFORD GM, BARUCH DE, RIEDNER BA, HELMSTETTER FJ. 2006. Long-term stability of fear memory depends on the synthesis of protein but not mRNA in the amygdala. *Eur J Neurosci.* 23: 1853-1859.
- PAVLOV IP. 1927. *Conditioned Reflexes*. London: Oxford University Press.

- PAVLOV IP. 1949. Complete Works, Vol. III . Moscow: Academy of Science Press.
- PAXINOS G, WATSON C. 2009. The rat brain in stereotaxic coordinates. Compact 6th ed. San Diego, CA: Academic Press.
- PENDYAM S, BRAVO-RIVERA C, BURGOS-ROBLES A, SOTRES-BAYON F, QUIRK GJ, NAIR SS. 2012. Fear signaling in the prelimbic-amygdala circuit: a computational modeling and recording study. *J Neurophysiol.* 110: 844-61.
- PEREIRA ME, ROSAT R, HUANG CH, GODOY MG, IZQUIERDO I. 1989. Inhibition by diazepam of the effect of additional training and of extinction on the retention of shuttle avoidance behavior in rats. *Behav Neurosci.* 103: 202-5.
- PETERS J, KALIVAS PW, QUIRK GJ. 2009. Extinction circuits for fear and addiction overlap in prefrontal cortex. *Learn Mem.* 16:279-88.
- PITMAN RK, RASMUSSEN AM, KOENEN KC, SHIN LM, ORR SP, GILBERTSON MW, MILAD MR, LIBERZON I. 2012. Biological studies of post-traumatic stress disorder. *Nat Rev Neurosci.* 13: 769-787.
- PHELPS EA, LEDOUX JE. 2005. Contributions of the amygdala to emotion processing: from animal models to human behavior. *Neuron.* 48: 175-87.
- PRZYBYSLAWSKI J, SARA SJ. 1997. Reconsolidation of memory after its reactivation. *Beh Brain Resear.* 84:241-6.
- PUENTE N, CUI Y, LASSALLE O, LAFOURCADE M, GEORGES F, VENANCE L, GRANDES P, MANZONI OJ. 2011. Polymodal activation of the endocannabinoid system in the extended amygdala. *Nat Neurosci.* 14: 1542-7.
- PUIGHERMANAL E, BUSQUETS-GARCIA A, MALDONADO R, OZAITA A. 2012. Cellular and intracellular mechanisms involved in the cognitive impairment of cannabinoids. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 367: 3254-63.
- QUINN JJ, MA QD, TINSLEY MR, KOCH C, FANSELOW MS. 2008. Inverse temporal contributions of the dorsal hippocampus and medial

prefrontal cortex to the expression of long-term fear memories. *Learn. Mem.* 15: 368-372.

RAKIC P. 2009. Evolution of the neocortex: a perspective from developmental biology. *Nat Rev Neurosci.* 10: 724-35.

REHBERG K, BERGADO-ACOSTA JR, KOCH JC, STORK O. 2010. Disruption of fear memory consolidation and reconsolidation by actin filament arrest in the basolateral amygdala. *Neurobiol Learn Mem.* 94:117-126.

RESCORLA RA, HETH CD. 1975. Reinstatement of fear to an extinguished conditioned stimulus. *J. Exp. Psychol. Anim. Behav. Process.* 1: 88-96.

RESCORLA RA. 2004. Spontaneous recovery varies inversely with the training-extinction interval. *Learn Behav* 32: 401-408.

RESSTEL LB, TAVARES RF, LISBOA SF, JOCA SR, CORRÊA FM, GUIMARÃES FS. 2009. 5-HT_{1A} receptors are involved in the cannabidiol-induced attenuation of behavioural and cardiovascular responses to acute restraint stress in rats. *Br J Pharmacol* 156: 181-188.

ROBERTO M, CRUZ M, BAJO M, SIGGINS GR, PARSONS LH, SCHWEITZER P. 2010. The endocannabinoid system tonically regulates inhibitory transmission and depresses the effect of ethanol in central amygdala. *Neuropsychopharmacology.* 35: 1962-72.

RUEHLE S, REMMERS F, ROMO-PARRA H, MASSA F, WICKERT M, WÖRTGE S, HÄRING M, KAISER N, MARSICANO G, PAPE HC, LUTZ B. 2013. Cannabinoid CB₁ receptor in dorsal telencephalic glutamatergic neurons: distinctive sufficiency for hippocampus-dependent and amygdala-dependent synaptic and behavioral functions. *J Neurosci.* 33: 10264-77.

RUSSO EB, BURNETT A, HALL B, PARKER KK. 2005. Agonistic properties of cannabidiol at 5-HT_{1a} receptors. *Neurochem Res* 30:1037-1043.

SAKATA K, MARTINOWICH K, WOO NH, SCHLOESSER RJ, JIMENEZ DV, JI Y, SHEN L, LU B. 2013. Role of activity-dependent BDNF expression in hippocampal-prefrontal cortical

- regulation of behavioral perseverance. *Proc Natl Acad Sci U S A*.110:15103-8.
- SANTANA N, MENGOD G, ARTIGAS F. 2013. Expression of $\alpha(1)$ -adrenergic receptors in rat prefrontal cortex: cellular co-localization with 5-HT(2A) receptors. *Int J Neuropsychopharmacol*. 16: 1139-51.
- SANTINI E, QUIRK GJ, PORTER JT. 2008. Fear conditioning and extinction differentially modify the intrinsic excitability of infralimbic neurons. *J Neurosci*. 28:4028-36.
- SCHILLER D, PHELPS EA. 2011. Does reconsolidation occur in humans? *Front Behav Neurosci*. 5:24.
- SCHWABE L, NADER K, WOLF OT, BEAUDRY T, PRUESSNER JC. 2012. Neural signature of reconsolidation impairments by propranolol in humans. *Biol Psychiatry*. 71: 380-6.
- SHARPE MJ, KILLCROSS S. 2013. The Prelimbic Cortex Contributes to the Down-Regulation of Attention Toward Redundant Cues. *Cereb Cortex*, in press.
- SHRIVASTAVA A, KUZONTKOSKI PM, GROOPMAN JE, PRASAD A. 2011. Cannabidiol induces programmed cell death in breast cancer cells by coordinating the cross-talk between apoptosis and autophagy. *Mol Cancer Ther*.10: 1161-72.
- SCOVILLE WB, MILNER B. 1957. Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J. Neurol. Psychiatry* 20:11–21.
- SEVENSTER D, BECKERS T, KINDT M. 2013. Prediction error governs pharmacologically induced amnesia for learned fear. *Science*. 2013. 339: 830-3.
- SHAH AA, SJOVOLD T, TREIT D. 2004. Inactivation of the medial prefrontal cortex with the GABAA receptor agonist muscimol increases open-arm activity in the elevated plus-maze and attenuates shock-probe burying in rats. *Brain Res*. 1028: 112-115.
- SCHAFE GE, LEDOUX JE. 2000. Memory consolidation of auditory pavlovian fear conditioning requires protein synthesis and protein kinase A in the amygdala. *J Neurosci* 20: RC96.

- SHIN LM, RAUCH SL, PITMAN RK. 2006. Amygdala, medial prefrontal cortex, and hippocampal function in PTSD. *Ann N Y Acad Sci.*1071: 67-79.
- SIERRA-MERCADO D JR, CORCORAN KA, LEBRÓN-MILAD K, QUIRK GJ. 2006. Inactivation of the ventromedial prefrontal cortex reduces expression of conditioned fear and impairs subsequent recall of extinction. *Eur J Neurosci.* 24:1751-1758.
- SOULÉ J, PENKE Z, KANHEMA T, ALME MN, LAROCHE S, BRAMHAM CR. 2008. Object-place recognition learning triggers rapid induction of plasticity-related immediate early genes and synaptic proteins in the rat dentate gyrus. *Neural Plast.* 2008: 269097.
- SQUIRE LR, DAVIS HP.1981. The pharmacology of memory: a neurobiological perspective. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 21: 323-56.
- STEFANACCI L, AMARAL DG. 2002. Some observations on cortical inputs to the macaque monkey amygdala: an anterograde tracing study. *J Comp Neurol.* 451: 301-323.
- STEIN DJ, IPSEY JC, SEEDAT S. 2006. Pharmacotherapy for post traumatic stress disorder (PTSD). *Cochrane Database Syst Rev.*1:CD002795.
- STERN CA, DO MONTE FH, GAZARINI L, CAROBREZ AP, BERTOGLIO LJ. 2010. Activity in prelimbic cortex is required for adjusting the anxiety response level during the elevated plus-maze retest. *Neuroscience.* 170:214-22.
- STRIEDTER, G. F. 2005. *Principles of Brain Evolution.* Sinauer, Sunderland, Massachusetts.
- SURÍS A, SMITH J, POWELL C, NORTH CS. 2013. Interfering with the reconsolidation of traumatic memory: sirolimus as a novel agent for treating veterans with posttraumatic stress disorder. *Ann Clin Psychiatry.*25:33-40.
- SUZUKI A, JOSSELYN SA, FRANKLAND PW, MASUSHIGE S, SILVA AJ, KIDA S. 2004. Memory reconsolidation and extinction have distinct temporal and biochemical signatures. *J Neurosci.*24: 4787-4795.
- SUZUKI A, MUKAWA T, TSUKAGOSHI A, FRANKLAND PW, KIDA S. 2008. Activation of LVGCCs and CB1 receptors required for

destabilization of reactivated contextual fear memories. *Learn Mem.* 15: 426-33.

SIERRA-MERCADO D, PADILLA-COREANO N, QUIRK GJ. 2011. Dissociable roles of prelimbic and infralimbic cortices, ventral hippocampus, and basolateral amygdala in the expression and extinction of conditioned fear. *Neuropsychopharmacology.* 36:529-38.

TAN H, LAUZON NM, BISHOP SF, BECHARD MA, LAVIOLETTE SR. 2010. Integrated cannabinoid CB1 receptor transmission within the amygdala-prefrontal cortical pathway modulates neuronal plasticity and emotional memory encoding. *Cerebral Cortex.* 20:1486-96.

TAN H, LAUZON NM, BISHOP SF, CHI N, BECHARD M, LAVIOLETTE SR. 2011. Cannabinoid transmission in the basolateral amygdala modulates fear memory formations via functional inputs to the prelimbic. *J Neurosci.*31: 5300-5312.

TAKEHARA K, KAWAHARA S, KIRINO Y. 2003. Time-dependent reorganization of the brain components underlying memory retention in trace eyeblink conditioning. *J Neurosci.*23: 9897-905.

TAUBENFELD SM, RICEBERG JS, NEW AS, ALBERINI CM. 2009. Preclinical assessment for selectively disrupting a traumatic memory via postretrieval inhibition of glucocorticoid receptors. *Biol Psychiatry* 65: 249-257.

THOMAS A, BAILLIE GL, PHILLIPS AM, RAZDAN RK, ROSS RA, PERTWEE RG. 2007. Cannabidiol displays unexpectedly high potency as an antagonist of CB1 and CB2 receptor agonists in vitro. *Br J Pharmacol.*150: 613-23.

THOMAS KL, HALL J, EVERITT BJ. 2002. Cellular imaging with zif268 expression in the rat nucleus accumbens and frontal cortex further dissociates the neural pathways activated following the retrieval of contextual and cued fear memory. *Eur J Neurosci* 16: 1789-1796.

TOTAH NK, JACKSON ME, MOGHADDAM B. 2013. Preparatory Attention Relies on Dynamic Interactions between Prelimbic Cortex and Anterior Cingulate Cortex. *Cerebral Cortex.* 23:729-38.

TÓTH A, BOCZÁN J, KEDEI N, LIZANECZ E, BAGI Z, PAPP Z, EDES I, CSIBA L, BLUMBERG PM. 2005. Expression and distribution of

- vanilloid receptor 1 (TRPV1) in the adult rat brain. *Brain Res Mol Brain Res.* 135: 162-8.
- TRONSON NC, WISEMAN SL, OLAUSSON P, TAYLOR JR. 2006. Bidirectional behavioral plasticity of memory reconsolidation depends on amygdalar protein kinase A. *Nat Neurosci.* 9: 167-169.
- TRONSON NC, TAYLOR JR. 2013. Addiction: a drug-induced disorder of memory reconsolidation. *Curr Opin Neurobiol.* 23: 573-80.
- TSE D, TAKEUCHI T, KAKEYAMA M, KAJII Y, OKUNO H, TOHYAMA C, BITO H, MORRIS RG. 2011. Schema-dependent gene activation and memory encoding in neocortex. *Science.* 333:891-5.
- TULVING E. 1983. *Elements of Episodic Memory.* Oxford: Clarendon Press
- YEHUDA R. 2000. Biology of posttraumatic stress disorder. *J Clin Psychiatry.* 7:14-21.
- YEHUDA R, JOËLS M, MORRIS RG. 2010. The memory paradox. *Nat Rev Neurosci* 11: 837-839.
- YU LL, WANG XY, ZHAO M, LIU Y, LI YQ, WANG X, XUE YX, LU L. 2009 Effects of cannabinoid CB1 receptor antagonist rimonabant in consolidation and reconsolidation of methamphetamine reward memory in mice. *Psychopharmacol (Berl)* 204:203–211.
- VERTES RP. 2004. Differential projections of the infralimbic and prelimbic cortex in the rat. *Synapse.* 51:32-58.
- VERTES RP. 2006. Interactions among the medial prefrontal cortex, hippocampus and midline thalamus in emotional and cognitive processing in the rat. *Neuroscience.* 142: 1-20.
- WEISBERG RB. 2009. Overview of generalized anxiety disorder: epidemiology, presentation, and course. *J Clin Psychiatry* 70: 4 –9.
- WORLEY PF, CHRISTY BA, NAKABEPPU Y, BHAT RV, COLE AJ, BARABAN JM. 1991. Constitutive expression of zif268 in neocortex is regulated by synaptic activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88: 5106-10.

ZELIKOWSKY M, BISSIERE S, HAST TA, BENNETT

RZ, ABDIPRANOTO A, VISSEL B, FANSELOW MS. 2013.

Prefrontal microcircuit underlies contextual learning after hippocampal loss. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 110: 9938-43.

ZHANG Y, FUKUSHIMA H, KIDA S. 2011. Induction and requirement of gene expression in the anterior cingulate cortex and medial prefrontal cortex for the consolidation of inhibitory avoidance memory. *Mol Brain*. 19: 4 - 4.

ZUARDI AW, SHIRAKAWA I, FINKELFARB E, KARNIOL IG. 1982.

Action of cannabidiol on the anxiety and other effects produced by delta 9-THC in normal subjects. *Psychopharmacology (Berl)*. 76: 245-50.

ZUARDI AW, COSME RA, GRAEFF FG, GUIMARÃES FS. 1993.

Effects of ipsapirone and cannabidiol on human experimental anxiety. *J Psychopharmacol*. 7: 82-8.

10. Anexo: Artigos publicados

Neuropsychopharmacology, 2012, 37(9):2132-42.

On disruption of fear memory by reconsolidation blockade: evidence from cannabidiol treatment.

Stern CA, Gazarini L, Takahashi RN, Guimarães FS, Bertoglio LJ.

Abstract

The search for reconsolidation blockers may uncover clinically relevant drugs for disrupting memories of significant stressful life experiences, such as those underlying the posttraumatic stress disorder. Considering the safety of systemically administered cannabidiol (CBD), the major non-psychotomimetic component of *Cannabis sativa*, to animals and humans, the present study sought to investigate whether and how this phytocannabinoid (3-30 mg/kg intraperitoneally; i.p.) could mitigate an established memory, by blockade of its reconsolidation, evaluated in a contextual fear-conditioning paradigm in rats. We report that CBD is able to disrupt 1- and 7-days-old memories when administered immediately, but not 6 h, after their retrieval for 3 min, with the dose of 10 mg/kg being the most effective. This effect persists in either case for at least 1 week, but is prevented when memory reactivation was omitted, or when the cannabinoid type-1 receptors were antagonized selectively with AM251 (1.0 mg/kg). Pretreatment with the serotonin type-1A receptor antagonist WAY100635, however, failed to block CBD effects. These results highlight that recent and older fear memories are equally vulnerable to disruption induced by CBD through reconsolidation blockade, with a consequent long-lasting relief in contextual fear-induced freezing. Importantly, this CBD effect is dependent on memory reactivation, restricted to time window of <6 h, and is possibly dependent on cannabinoid type-1 receptor-mediated signaling mechanisms. We also observed that the fear memories disrupted by CBD treatment do not show reinstatement or spontaneous recovery over 22 days. These findings support the view that reconsolidation blockade, rather than facilitated extinction, accounts for the aforementioned CBD results in our experimental conditions ([doi: 10.1038/npp.2012.63](https://doi.org/10.1038/npp.2012.63)).

<http://www.nature.com/npp/journal/v37/n9/full/npp201263a.html>

Learning and Memory, 2013, 21(1):14-20.

Activity in prelimbic cortex subserves fear memory reconsolidation over time.

Stern CA, Gazarini L, Vanvossen AC, Hames MS, Bertoglio LJ.

Abstract

The prelimbic cortex has been implicated in the consolidation of previously learned fear. Herein, we report that temporarily inactivating this medial prefrontal cortex subregion with the GABAA agonist muscimol (4.0 nmol in 0.2 μ L per hemisphere) was able to equally disrupt 1-, 7-, and 21-d-old contextual fear memories after their brief retrieval in rats. In all cases, this effect was prevented when memory reactivation was omitted. These results indicate that recent and remote fear memories are susceptible to reconsolidation blockade induced by prelimbic cortex inactivation. It was also demonstrated that the disrupting effect of prelimbic cortex inactivation on fear memory persisted over 11 d, and did not show extinction-related features, such as reinstatement. Infusing the same dose and volume of muscimol bilaterally into the infralimbic cortex after brief retrieval/reactivation of the fear memory did not disrupt it, as seen in prelimbic cortex-inactivated animals. The expression of Zif268/Egr1, the product of an immediate early gene related to memory reconsolidation, was also less pronounced in the infralimbic cortex than in prelimbic cortex following memory retrieval/reactivation. Altogether, the present findings highlight that activity in the prelimbic cortex may reestablish reactivated aversive memories and, therefore, contribute to their maintenance over time (doi: 10.1101/lm.032631.113).

<http://learnmem.cshlp.org/content/21/1/14.long>

